

36
24



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES

C U A U T I T L A N

PROYECTO DE NORMA OFICIAL PARA EL CONTROL
MICROBIOLOGICO DE COSMETICOS EN MEXICO

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

JOSE FRANCISCO SANABRIA CANO

Director de Tesis:

Q.F.I. CRISTINA REYES GONZALEZ



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.

INDICE

I. - INTRODUCCION.	1
II. - OBJETIVOS.	3
III. - GENERALIDADES.	4
3.1. - ETIMOLOGIA	4
3.2. - DEFINICION	4
3.3. - HISTORIA	4
3.4. - CLASIFICACION DE LOS COSMETICOS.	6
3.5. - PRESERVACION DE LOS COSMETICOS.	13
IV. - METODOLOGIA DE LA ASOCIACION DE COSMETICOS PRODUCTOS PARA EL TOCADOR Y FRAGANCIAS .	37
4.1 - INTRODUCCION	37
4.2. - METODOS MICROBIOLOGICOS USADOS POR LOS LA- BORATORIOS MIEMBROS DE LA CIPA.	41
4.3. - PRUEBA PILOTO	42
4.4. - RESULTADOS DE LA PRUEBA PILOTO	43
4.5. - CONCLUSIONES DE LA PRUEBA PILOTO.	44
4.6. - PRUEBA GLOBAL.	45
4.7. - RESULTADOS GLOBALES.	46
4.8 - CONCLUSIONES DE LA PRUEBA GLOBAL	63
V. - PROYECTO TENTATIVO DE TECNICA PARA EL CON- TROL MICROBIOLOGICO DE COSMETICOS EN MEXICO.	64
5.1. - MANEJO DE LAS MUESTRAS.	64
5.2. - MUESTREO	64
5.3. - CRITERIO DE ACEPTACION	64
5.4. - DEFINICIONES.	65
5.5. - NORMA DE LA SECRETARIA DE SALUD PARA EL CON- TROL MICROBIOLOGICO DE COSMETICOS.	65
5.6. - METODOS DE PRUEBA	66
5.7. - METODOS DE SIEMBRA.	70
5.8. - APLICACION DE LOS METODOS MICROBIOLOGICOS AL CONTROL DE PRODUCTOS COSMETICOS NO ESTERILES.	71
5.9 - INVESTIGACION DE MICROORGANISMOS PATOGENOS	76

VI. - RESUMEN	36
VII. - CONCLUSIONES.	90
VIII. - ANEXOS.	91
8.1. - DEFINICIONES.	91
8.2. - LISTA DE CONSERVADORES Y NEUTRALIZANTES.	92
IX. - BIBLIOGRAFIA	94

INDICE DE TABLAS.

TABLA	DESCRIPCION	PAGINA
TABLA 1	Listas de conservadores más usados en 1987.	16
TABLA 2	Especies de Asperquillus por su color.	19
TABLA 3	Especies de Rhizopus por su color	20
TABLA 4	pH óptimos para el desarrollo de algunas bacterias.	27
TABLA 4.1	Ka del ácido benzoico en función del pH.	33
TABLA 5	Concentración mínima inhibitoria de Asperquillus.	33
TABLA 6	Coficentes de partición del éster metílico en diversas merclas de aceite y agua.	36
TABLA 7	Porcentaje total de ventas de cosméticos a nivel mundi-- al.	37
TABLA 8	Porcentaje de ventas por especialidad cosmética.	38
TABLA 9	Ventas de cosméticos en Chile.	39
TABLA 10	Métodos usados por los laboratorios miembros de la CTFA	41
TABLA 11	Muestras para la prueba piloto.	42
TABLA 12	Comparación de métodos en placa enriquecidos.	43
TABLA 13	Resumen del contenido microbiano para todos los produc-- tos.	48
TABLA 14	Clasificación de los productos por formulación.	49
TABLA 15	Productos clasificados por formulación y categorías, pa-- a 28 ra muestras con un contenido microbiano mayor de 20 M.O. por gramo de producto.	49-60
TABLA 29	Cantidad total de muestras positivas.	61
TABLA 30	Resumen de la cantidad y tipo de M.O.	62
TABLA 31	Tabla de temperaturas y tiempos de incubación.	72
TABLA 32	Reacciones de las bacterias de la familia Enterobacteria-- ceae.	80

TABLA	DESCRIPCION	PAGINA
TABLA 33	Características diferenciales de <i>Ps. aeruginosa</i>	83
TABLA 34	Lista de conservadores y sus neutralizantes.	92

INDICE DE GRAFICOS

GRAFICO	DESCRIPCION	PAGINAS
1	Frecuencia del uso de los derivados del éster del ácido para hidroxibenzoico.	17
2	Porcentaje del total de ventas de cosméticos.	38
3	Ventas de cosméticos en Chile	39
4	Tipo de formulaciones V.S. el 3 de muestras con más de 20 M.O. / g de producto.	49
5 - 15	Categoría del producto V.S. 3 de muestras positivas.	50-60
16	Porcentaje de muestras positivas para todas las categorías.	61

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCION	PAGINA
1	Penicillum	18
2	Mucor	21
3	Modelo de W. Ostwald	67
4	Modelo de Schulman Cockbain	68

INDICE DE DIAGRAMAS

DIAGRAMA	DESCRIPCION	PAGINA
I	Identificación de Escherichia coli	77
II	Aislamiento de Salmonella y Shigella.	79
III	Aislamiento de Staphylococcus aureus.	82
IV	Aislamiento de Pseudomona aeruginosa.	84
V	Identificación de Cándida albicans.	85

I. - INTRODUCCION:

En los últimos años en México y en casi todos los países del mundo, existe una gran preocupación por parte de productores, investigadores y legisladores, sobre la contaminación microbiológica de los productos de cosmética e higiene. La preocupación se debe a los riesgos y peligros que ocasionan a la salud del consumidor y a la estabilidad del preparado. (1) (2) (3)

La mayor parte de los países desarrollados cuentan con normas oficiales para el control microbiológico. En los Estados Unidos alrededor de 450 mil pruebas microbiológicas se desarrollan cada año, y otra cantidad importante en el Japón y en los países de la Comunidad Europea. Las pruebas tienden a ser automatizadas de rápida detección, enumeración e identificación. (4) (5) (7)

En México se cuenta con normas oficiales, pero no existen técnicas ni procedimientos oficiales para evaluar el control microbiológico, cada laboratorio cuenta con sus propias técnicas y procedimientos. En su mayoría los laboratorios que fabrican productos cosméticos pertenecen a la Asociación de Productos Cosméticos para el Tocador y Fragancias (CIFA), la cual ha desarrollado técnicas y normas de control microbiológico y la aplican la mayoría de sus miembros. (7) (8)

La Secretaría de Salud, en su departamento de Regulación y Control Sanitario de Productos de Perfumería y Belleza ve la necesidad de que México cuente con sus propias normas y técnicas para el control microbiológico, las cuales estén al tanto con el momento y las necesidades del país. Para lo cual se ha propuesto varios trabajos de investigación como es el caso de esta tesis.

En esta tesis se investigaron los problemas que se tienen en la preservación y manejo de los cosméticos, así como la recopilación y selección de técnicas desarrolladas por los miembros de la Cámara Nacional de la Industria de la Perfumería y Cosmética (CANIPEC) y la Asociación de Productos de Cosmética Tocador y Fragancias (CTFA).

Por falta de presupuesto no se realizó un estudio experimental de validación de las técnicas propuestas, pero en su caso se investigaron reportes experimentales realizados en gran escala por los laboratorios miembros de la CTFA, los cuales ejemplificaron la efectividad y veracidad de estas técnicas.

Se estudió una clasificación universal para el manejo y control de los cosméticos, con el fin de simplificar las técnicas de control microbiológico, dando una mayor importancia a la identificación de microorganismos patógenos más comunes encontrados en cosméticos como es el caso de: *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Fs. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans*. Además se propuso el desarrollo de una técnica tentativa para el control microbiológico de los productos cosméticos, así como los aspectos legales que se requirieran para ser posteriormente oficializada como norma para el control microbiológico de cosméticos y productos para el tocador en México.

7.0 OBJETIVOS:

- 1.- RECOPIRAR LOS METODOS MAS IMPORTANTES QUE SE ENCUENTRAN PARA EL CONTROL MICROBIOLOGICO DE COSMETICOS.
- 2.- DESARROLLAR UN PROYECTO TENTATIVO DE NORMA OFICIAL EN MEXICO.

III GENERALIDADES.

3.1 ETIMOLOGIA:

La palabra cosmético se deriva del término griego 'Kosmos' que significa el universo concebido como un sistema ordenado y armonioso. El término griego 'Kosmetikos' se define como el arte en el decorado, teniendo otra acepción, ornamento. (10)(11)

3.2 DEFINICION:

A) - Cosmético es toda substancia o preparado destinado a ser puesto en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales con la finalidad de limpiarlas, perfumarlas o protegerlas, para mantenerlas en buen estado, modificando su aspecto o corregir malos olores. (9)

B) - La Ley General de Salud en el título XII, capítulo IX, art. 263 considera como cosméticos: las substancias de uso externo, destinadas a incrementar, preservar o restituir la belleza del cuerpo humano o mejorar su apariencia.' (10)(12)

3.3 HISTORIA:

Las investigaciones antropológicas, arqueológicas y etnológicas, revelan el uso de perfumes y cosméticos, desde el siglo V A.C. En Egipto, Sumria, Asiria, Caldea e India, así como en ciertas regiones del Hemisferio Occidental como en México y Perú.

Las primeras menciones de las sustancias aromáticas se refieren a su uso en ceremonias religiosas, en que se usaban aceites y unguentos para ungir con ellos a vivos y muertos en diversos ritos religiosos.

La cosmética esta ligada a la historia de la medicina aunque mezclada con astrología, misticismo y religión. Hipócrates disoció la medicina y la cosmética de la magia, superstición y religión, incorporando a la cosmética estudios de dermatología y adecuando a dietas discretas, exposición al sol baños especiales y masajes que pronto llevaron a los griegos a un verdadero culto a la perfección física. Los romanos en aquellas épocas no dieron importancia a la ciencia ni a las artes; se ocupaban más de la agricultura y la guerra. Después de la ocupación de Alejandría por Julio César, Roma se convirtió en el centro cultural de Europa. El personaje mas importante del periodo Helenístico fué la reina Cleopatra cuyo nombre se ha perpetuado como el símbolo de la cosmética.

Galeno considerado como el médico más eminente de la antigüedad, posterior a Hipócrates, en el primero de sus diez libros sobre remedios locales describe metódica y científicamente la materia cosmética. Precisamente de Galeno proviene el "Ceratum Refrigeratum" prototipo del conocido hasta nuestros días como Cold Cream.

Las preparaciones cosméticas en los primeros siglos de la era cristiana fueron: limpiadores, maquillajes, tratamientos para la ressequedad, arrugas, pecas, verrugas, cicatrices; depilatorios, desodorantes, fijadores de cabello, aclaradores, tinturas; tratamientos para la calvicie, piojos; enjuagues bucales, acrecentadores del busto y perfumes para todo uso.

Durante la Edad Media, los manuscritos sobre medicina, filosofía, cosmética y otros temas científicos se fuéron perdiendo, pero los monjes se dieron a la tarea de rescatarlos y archivarlos en sus monasterios, en los cuales muchos de ellos permanecieron olvidados. Algunos otros fueron rescatados por los iniciadores del naciente Islam, persas, sirios, cristianos y judios de origen español.

Los musulmanes conquistaron el Medio Oriente, Norte de Africa y España, pero no destruyeron la civilización, sino que asimilaron todo lo que consideraron de valor; poco fué lo que aportaron a la cosmética, pero conservaron sus hábitos de higiene y de ahí proviene el baño turco

Durante el Renacimiento decreció la investigación y el uso de los cosméticos que prácticamente se limitó al polvo y al colorante facial. La perfumería avanzó notablemente y empezó a industrializarse. Su fabricación comienza con un italiano radicado en Colonia, Giovanni Maria Farina, quien sacó al mercado en 1775 un producto denominado "Eau de Cologne", que perdura hasta nuestros días. El jabón se empezó a fabricar en Inglaterra en 1641

Después de la independencia de los E.U. llegaron inmigrantes perfumistas de Europa que empezaron a fabricar materias aromáticas no sintéticas con lo que este país empezó a desarrollar esta industria, mientras tanto la perfumería seguía desarrollándose en Francia y otros países como Italia, Inglaterra, Holanda y España. El siglo XIX se inicia la industria de la perfumería ya con marcas, seguida de la cosmética. Hasta principio de siglo se inició la verdadera investigación que fué publicada en tratados, siendo los primeros en cosmética los de Maison G. Navarre y R.G. Harry en 1941, que iniciaron la verdadera ciencia cosmética que tenemos en la actualidad. (19) (20)

3.4. Clasificación de los Cosméticos. (11) (12) (14)

1).- Clasificación de acuerdo al uso de los cosméticos:

- A) - Cosméticos de adorno.
- B) - Cosméticos de higiene
- C) - Cosméticos protectores
- D) - Cosméticos de tratamiento

2).- Clasificación Tecnológica de los Cosméticos.

En la actualidad mundialmente se reconocen seis formas cosméticas fundamentales, de las cuales se derivan todas las demás, y son tomadas en esta tesis como modelo de clasificación: (14) (48)

- A) - Polvos.
- B) - Líquidos.
- C) - Emulsiones.
- D) - Geles.
- E) - Sólidos.
- F) - Aerosoles.

A) - Polvos.

Son cosméticos resultantes de la división de sustancias de origen fundamentalmente inorgánico y de una mezcla que asegure su homogeneidad. Son estudiados por la micromerítica, la cual se dedica a determinar las propiedades físicas de las partículas: densidad, porosidad, compactación, sedimentación y fluidez. (14) (15) (16)

Ejemplos:

- Talcos.
- Pulimento y brillo para uñas.
- Sales para Baño
- Polvos desodorantes.
- Polvos granulados de limpieza profunda.

A) - Líquidos

1. - Soluciones:

Son cosméticos obtenidos por la disolución de una o más sustancias en un solvente o sistema de solventes. La solubilidad de un compuesto depende de las propiedades físicas y químicas del soluto y del solvente, y otros factores como; la temperatura, presión y pH de la solución y en menor proporción, del estado de subdivisión del soluto. (14) (15)

Ejemplos:

- Soluciones refrescantes, estimulantes y astringentes.
- Soluciones para antes y después de afeitarse.
- Desodorantes.
- Fijadores.
- Soluciones para alaciar el cabello.
- Soluciones para permanentes.
- Soluciones capilares.
- Tinturas.
- Brillantinas.
- Esmaltes y quita esmaltes.
- Enjuagues bucales y dentífricos.
- Aceites para baño.
- Bronceadores.

2. - Suspensiones:

Son preparaciones que contienen una o más agentes sólidos dispersos en un medio fluido. Estas partículas presentan en su mayoría un diámetro superior a 8 μ (algunas presentan al microscopio un movimiento browniano cuando la viscosidad es baja). (16) (17)

Poco se sabe de las condiciones energéticas de las partículas en suspensión, pero sin embargo se sabe que se necesita cierto trabajo para reducir un sólido a pequeñas partículas y dispersarlas en un medio continuo. La gran superficie de las partículas que surge como consecuencia de la pulverización, va asociada con una energía libre superficial que hace al sistema termodinámicamente inestable, las partículas estarán en constante movimiento agrupándose para disminuir el área superficial y con ella la energía libre superficial. Por lo tanto las partículas en suspensión tenderán a flocular al unirse por pequeñas fuerzas de Van der Waals, pero en ciertas condiciones se puede unir por fuerzas de naturaleza más fuerte formando agregados.

Para que una suspensión llegue al equilibrio es necesario que la energía libre superficial sea reducida hasta que alcance el equilibrio, esto se logra disminuyendo la tensión y el área superficial.

$$[G = \sigma A] \text{ ----- EC III}$$

G = Energía libre Superficial.

σ = Tensión interfacial entre el líquido y las partículas sólidas.

A = Área Superficial total.

Ejemplos:

- Maquillajes para cara y piernas.
- Suspensiones para el acné.

C). - Emulsiones.

Una emulsión se define como un sistema disperso de dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales se encuentra disperso en el otro. La estabilización se logra mediante la adición de ciertas sustancias que constituyen la fase emulgente o emulsificadora.

En las emulsiones comunes, el tamaño de partícula oscila entre 100 y 50.000 μ m. Cuando los diámetros son menores de 50 μ m, se puede obtener sistemas transparentes. En este caso se puede hablar de una micro emulsión o dispersión transparente.

Las emulsiones pueden pertenecer a cualquiera de los dos tipos siguientes: aceite en agua (O/W) o agua en aceite (W/O). Para los primeros se usan agentes espesantes y humectantes: gomas, alginatos, y sintéticos como la polivinilpirrolidona y metil celulosa.

Los humectantes estabilizan la fase acuosa evitando la pérdida de agua en las emulsiones (O/W) y estabilizando las partículas de signo contrario. Como humectantes se emplean: la glicerina, sorbitan, polietilenglicol de bajo peso molecular y el ácido láctico.

Para las emulsiones (W/O) además de los emulgentes antes citados, se emplean: lauril sulfato sódico, estearato de trietanolamina etc. (14) (15) (17)
Ejemplos:

- Emulsiones fluidas de limpieza.
- Emulsiones emolientes hidratantes.
- Emulsiones de base evanescente.
- Emulsiones para manos y cuerpo.
- Champús emulsionados.
- Enjuagues capilares emulsionados.
- Emulsiones oxidantes.

D).- Geles.

Los geles son sistemas dispersos que consisten en una masa condensada que contiene un líquido interpenetrado. Si el sistema es rico en la fase acuosa se le llama jalea; si por el contrario predomina la fase sólida, se le llama gel seco o xerogel. Los geles se clasifican de acuerdo a la forma de la micela; según su origen, orgánico o inorgánico y según la naturaleza de la fase líquida (hidrogeles-solvente agua) y (organogeles-líquido orgánico).

Los geles acuosos más importantes son los champues que se preparan con lauril sulfato de sodio y jabones de triestanolamina de los ácidos grasos de coco. algunos geles son preparados con resinas poliméricas carboxivinílicas del tipo carbopol, pero existen excelentes geles que se pueden preparar con tensioactivos como el polioxistilén lauril éter (Prij). los tween también gelifican pero a concentraciones más altas. Los derivados etoxilados de lanolina, son utilizados en la preparación de geles transparentes usando alcoholes de lanolina con varios grados de etoxilación. (14) (15)

Ejemplos:

- Geles de limpieza.
- Geles refrescantes.
- Colonias y preparados en gel para después de afeitarse.

E) - Sólidos.

Dentro de este grupo se encuentran los polvos ya mencionados anteriormente, los jabones, las barras y otras formas cosméticas. (15) (16)

Ejemplos:

- * Polvos Cosméticos.
- Jabones
- Barras desodorantes
- Plásticos con diversas formas colores y aromas.

F) - Aerosoles.

Los aerosoles son sistemas finamente dispersos, constituidos por una fase dispersante gas, y otra dispersa que puede ser líquida o (en forma de niebla) o sólida (formando humo) partículas de (2 a 25 μ). Popularmente se le denomina aerosol a todo sistema envasado a presión.

Las ventajas de esta forma son: su elegancia higiene y comodidad lo cual se ha impuesto en el mercado de la cosmética y en otras industrias como la de productos de limpieza para el hogar, insecticidas, productos veterinarios y pinturas.

El desarrollo de esta formulación se logró con los propelentes cloro fluorados: (CCl_3F) y diclorofluorometano (CCl_2F_2) hoy prohibidos en muchos países del mundo, debido a la destrucción de la capa de ozono en la atmósfera. (14) (15)

En la actualidad se están sustituyendo por otros propelentes como butano, propano y otros cloro fluorados inertes. Además del desarrollo de las válvulas y pistones, construidas para sistemas no aerosoles. El futuro de los aerosoles es incierto, pero se continúan usando, por ejemplo

- Láminas para el cabello
- Desodorantes antitráspirantes
- Espuma de afeitado etc.

3.5 PRESERVACION DE LOS COSMETICOS.

El problema de la preservación de preparaciones cosméticas es compleja y se incrementa por un gran número de problemas diferentes para cada producto y formulación, presentandose de manera particular y dependiendo de un gran número de factores, siendo algunos de los más importantes:

- 1).- La forma física del preparado: líquida, emulsión, gel, polvo etc.
- 2).- factores que afectan el crecimiento de los microorganismos: factores nutricionales, humedad, pH, temperatura etc
- 3).- Factores que afectan la acción del conservador: concentración naturaleza y cantidad de inóculo, incompatibilidad de las sustancias etc.
- 4).- Presencia de compuestos bacteriostáticos o fungistáticos.
- 5).- Pureza y limpieza de la materia prima y el mantenimiento de una operación sanitaria en la preparación y empaque del producto.

A Partir de lo anterior es evidente que el deterioro obedece a causas diversas; físicas, químicas, microbiológicas y enzimáticas. La evidencia del deterioro puede ser detectada organolépticamente por el consumidor (cambios en el olor, color y textura). Cambios en el aroma son debidos, a la presencia de sustancias volátiles, como aldehidos, cetonas, ácidos, aminas, mercaptanos etc.

Los cambios en el color pueden deberse al desarrollo de pigmentos producidos por: microorganismos, reacciones de oxidación y a otras reacciones químicas. Los cambios de textura pueden deberse a la hidrólisis de almidón, solubilización de proteínas y al desarrollo microbiano etc.

Casi todos los cosméticos que contienen agua son susceptibles a una contaminación microbiana. Preparaciones regularmente anhidras lápices labiales pueden requerir de conservadores. [18] [19] [20]

Todas las preparaciones que contienen grasas y aceites están sujetas a una mayor oxidación y deterioro microbiológico: mucilagos, ácidos grasos, lípidos, albúminas, hormonas y vitaminas, son los materiales que están sujetos a una mayor oxidación y deterioro microbiológico. Los microorganismos son extremadamente adaptables a condiciones desfavorables, por lo cual es importante adicionarle un conservador a cada cosmético a no ser que éste sea resistente al desarrollo de microorganismos.

3.5.1. Definición de Conservador:

Un conservador de cosméticos puede ser considerado como un agente que prolonga el almacenaje y la vida media de los cosméticos, por retardar o prevenir el deterioro. Para eliminar la ambigüedad de esta definición se hace la siguiente aclaración: La palabra conservador es usada para referirse a un compuesto capaz de prevenir el desarrollo de los microorganismos; antioxidante es un agente que retarda la oxidación y deterioro de grasas y aceites. (18) (21)

3.5.2. Características del Conservador. (1) (18) (21)

Un agente antimicrobiano o antioxidante ideal tiene los siguientes atributos:

- 1) - Que sea efectivo en las condiciones de uso.
- 2) - Que sea soluble a una concentración efectiva.
- 3) - Que sea estable y capaz de sostener su acción.
- 4) - Que sea incoloro e inodoro o demasiado bajo.
- 5) - Que sea económico dentro de la formulación del producto.
- 6) - Que no sea tóxico y no produzca irritación o sensibilización a la concentración empleada.

Este último atributo es de gran importancia ya que todo esfuerzo debe ser encaminado para eliminar de una preparación cosmética una posibilidad de irritación o sensibilización por un uso prolongado, también de una toxicidad causada por la ingestión inadvertida. Afortunadamente existen ahora compuestos que son seguros, pero no hay agente antimicrobiano que cuente con todos los requisitos ideales, pero muchos esfuerzos han sido hechos en éste campo

Conservadores como, formaldehído, alcohol, ácido bórico y ácido salicílico y derivados que fueron una vez muy usados son ahora descontinuados y solo son usados en circunstancias limitadas, y en concentraciones que dependen de la disponibilidad presente de otros compuestos. Numerosos investigadores dan la opinión sobre los conservadores más usados hoy en día como son los derivados del éster del ácido para hidroxibenzoico, que es el conservador más apropiado que reúne casi todos los requerimientos del conservador ideal

- 1).- No son tóxicos o su toxicidad es muy baja; son completamente inócuos en las concentraciones para su uso [11] [18] [21]
- 2).- El para hidroxibenzoato de metilo, tiene un ligero olor característico, pero los otros ésteres son prácticamente incoloros e inodoros.
- 3.- Son efectivos en un rango de pH de 3-9; así mismo son efectivos en bajas concentraciones. El metil parabeno que tiene una alta solubilidad en relación a los otros compuestos, es comunmente empleado en concentraciones de 0.1-0.2 % mientras que los otros ésteres son usados en soluciones casi saturadas [12] [68]
- 4).- El para hidroxibenzoato de metilo es efectivo contra hongos y bacterias.

3.5.3. Frecuencia de los Conservadores más usados en Cosméticos.

Los conservadores más usados en cosméticos cuyas formulaciones fueron registradas por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) en el título 21, del Código Federal de Regulación, parte 720, publicado el 1° de septiembre de 1987 son los siguientes: ver tabla No 1. (7) (21) (69) (70)

TABLE No 1

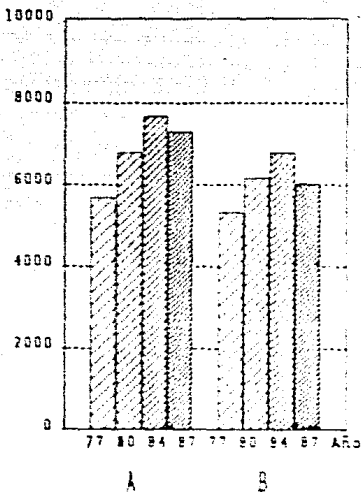
Lista de conservadores más usados durante 1987

Preservatives	1977	1980	1984	1987	Preservatives	1977	1980	1984	1987
Benzoic acid	5483	6785	7684	7305	Benzothiazolone chloride	26	27	25	10
Phenyl salicylate	6379	6174	6790	6630	Benzophenone-2	12	8	13	19
2-Methyl-2-hydroxypropane	1274	1684	2313	2690	Sodium methylparaben	8	12	15	18
Hydroxyacetone	463	868	803	1072	DMG	16	16	16	16
Quaternium-15	599	1027	1176	673	DMG hydantate	8	15	19	16
DMG	448	578	704	662	o-Phenyphenol	5	14	14	14
Allyl alcohol	27	119	247	487	2-Hydroxyethyl-2-hydroxypropane	23	29	8	10
1,2-Ethylene-2-methyl-4-hydroxypropane-2-one	0	38	222	512	Parabenzothiazolone chloramide	0	4	13	12
2-Methyl-2-hydroxypropane-2-one	0	38	222	512	Ascorbic acid lactate	2	7	7	12
Formaldehyde solution	888	874	711	672	Isobutylparaben	8	8	5	12
DMG	307	424	371	479	Quaternium-15	1	13	15	11
DMG hydantate	19	78	171	318	Benzylparaben	33	47	39	5
2-Hydroxy-2-ethylpropane-1,3-diol	364	344	426	317	Phenethyl alcohol	6	6	9	8
Phenylglyoxal	17	24	22	243	Benzothiazolone-2	61	36	7	1
Sodium hydroxyacetate	143	181	231	213	Phosphoric acid	8	8	3	6
Sorbic acid	455	283	194	199	Sodium o-phenyl phenate	14	13	8	5
Benzothiazolone-2	13	167	124	164	Allyl dimethyl PABA	8	8	5	5
Tris(1,2-ethylenediol)phosphate	118	131	162	151	Benzophenone-4	7	4	4	3
Triethanolamine	52	66	102	138	Chloroacetic acid hydroxyacetate	4	10	3	3
Benzothiazolone-2	8	6	53	30	Phenylisobutylamine	1	5	5	5
Benzothiazolone-2	65	84	112	126	Ascorbic acid	5	5	5	5
Phenyl glyoxal	132	121	129	119	Benzothiazolone-15	0	0	4	4
Sodium benzoate	118	94	48	100	Bis(2-hydroxyethyl) alcohol	0	0	2	4
Benzothiazolone-2	71	76	66	67	Bis(2-hydroxyethyl) sodium salt	0	4	4	4
Phenethyl alcohol	18	25	44	86	1-Nalyl hydroxylamine	2	5	5	7
2-Hydroxyethyl-2-hydroxypropane-2-one	8	17	41	58	Isopropyl alcohol	8	8	7	5
Triethanolamine	6	27	42	68	Bis(2-hydroxyethyl) ether	18	5	5	3
Chloroacetic acid	36	21	61	87	Merthiolone chloramide	4	4	18	3
1,2-Ethylene-2-hydroxypropane-2-one	8	12	11	46	Benzyl dimethyl PABA	6	2	2	2
Quaternium-15	42	67	11	43	Ascorbic acid	3	6	7	2
2-Hydroxyethyl-2-hydroxypropane-2-one	3	11	26	43	Benzophenone-8	8	8	1	3
Benzothiazolone chloramide	24	27	24	41	Benzyl benzoate	7	7	7	2
Chloroacetic acid	3	24	23	40	Diethyl sebacate	2	2	2	2
Allyl alcohol	23	23	33	39	Hydroxylamine	4	1	2	7
Phenylglyoxal	58	167	131	35	Phenol	4	4	4	2
Triethanolamine	25	40	36	43	Sodium chlorate	6	8	1	2
Triethanolamine	47	9	14	34	Sodium citrate	8	8	4	7
Triethanolamine	71	29	32	38	Sterbenzothiazolone chloramide	8	8	4	7
Sodium borate	6	23	24	29	Tetraacetate hydroxyacetate	6	8	2	2
Boric acid	29	23	34	28	Benzothiazolone-8	8	8	1	1
EDTA	13	23	12	21	Benzothiazolone-15	2	2	2	2
2-Hydroxyethyl-2-hydroxypropane-2-one	8	6	5	26	Hydroxylamine	3	4	1	1
Phenylglyoxal	10	13	12	24	Hydroxylamine	5	4	1	1
Phenylglyoxal	13	10	23	27	2-Hydroxyethyl-2-hydroxypropane-2-one	5	1	1	1
Triethanolamine	7	22	42	22	Sodium	1	1	1	1
Quaternium-15	8	6	2	1	Quaternium-15	8	6	2	1
Benzophenone-2	6	1	2	8	Benzophenone-3	6	2	2	1
Benzothiazolone-2	1	1	0	0	Benzothiazolone-4	1	1	0	0
Sodium hydroxyacetate	2	2	1	1	Sodium hydroxyacetate	2	2	1	1
Triethanolamine	19	13	15	12					

GRAFICO (1)

Frecuencia del uso de los derivados del éster del ácido parahidroxi benzoico. (21)

No de Muestras



A= Metil Parabeno.

B= Propil Parabeno.

3.5.4 Organismos encontrados en cosméticos.

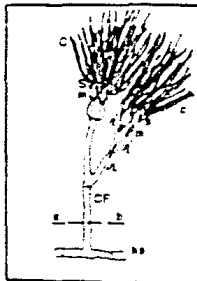
Desafortunadamente es muy poca la literatura que menciona la identificación de microorganismos encontrados en cosméticos. Sin embargo se encuentran artículos realizados por Galloway (1941) y enfatizada por Navarre, donde nos da una clara imagen de la contaminación de los cosméticos.

Los contaminantes microbiológicos de los cosméticos pueden ser hongos y bacterias siendo los primeros los más comúnmente encontrados, y en gran variedad, el cual se puede ver como un crecimiento filamentosos en la superficie de los cosméticos. Los hongos se reproducen generalmente por esporas, estas caen sobre la superficie húmeda germinando y produciendo redes filamentosas o hifas. Más tarde maduran y forman de nuevo esporas.

Los siguientes hongos son los más comúnmente encontrados en cosméticos:

1 - *Penicillium*, es un género de hongo repartido en casi todo el mundo y que se encuentra con suma frecuencia, sobre vegetales y frutas podridas en los cuales se puede observar como una fina capa aterciopelada. Al estudiar las especies de *Penicillium*, el aspecto y caracter de la colonia tiene importancia. Cada especie sobre un sustrato estandarizado como el de Grapek presenta un color característico, existiendo una gran gama de colores verde, azul, blanco, amarillo, anaranjado y rojizo, predominando el color verde. Por regla general el micelio aereo siempre es incoloro, mientras que el micelio que crece en el sustrato con frecuencia se halla coloreado. Sobre la superficie de la colonia *Penicillium* tiene una textura lanosa aterciopelada o granulosa. Las especies más importantes de este género son las siguientes: *Expansum*, *Italycum*, *Notatum*, *Roqueforti*, *Camberti*, *Cassii* color y *Brevicaulis* (18) (22) (23)

Figura 11



Estructura del *Penicillium* (22)

PENICILLIUM

UNA ESPECIE CON CONIDIOFORO,
cf), CITROMYCES, aa) SUPERFICIE DEL SUBSTRATO
c), CONIDIOS opt), CONIDIOFOROS aa) HIFA AEREA
aa) HIFA DEL SUBSTRATO bb) MEDULA DEL SUBSTRATO
RAMAS DEL CONIDIOFORO

7. *Aspergillus*: este género fué descrito en 1779 por el Italiano P.A. Micheli, en su obra "Nova plantarum". Le dió el nombre de "Aspergillus", derivado de las palabras latinas Asper-Aspero y Aspergere=rociar con un hisopo.

Los conidióforos no ramificados se forman a partir de una célula hifal engrosada, la llamada célula basal, con la cual el *Aspergillus* difiere del *Penicillium*, que no tiene célula basal. Las extremidades libres de los conidióforos están dilatadas en forma globulosa o de mata. En éste engrosamiento la esférula sostiene a una o dos filas de esterigmas. Debido a la posición radiada de las esterigmas sobre los conidióforos engrosados, a éste hongo se le llama "hongo de regadera".

El género *Aspergillus* se puede dividir en dos grupos principales debido a sus diferencias morfológicas. Un grupo contiene a las especies con una fila de esterigmas y el otro la de dos filas de esterigmas. Dentro de estos dos grupos principales se encuentran tres y once subgrupos, respectivamente. Los tres grupos citados en primer lugar son el grupo *Aspergillus glaucus*, el grupo *Aspergillus clavatus*, y el grupo *Aspergillus fumigatus*. De los once subgrupos citados sólo se mencionan los más importantes: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ventii* y el grupo *Aspergillus niger*. El color de las especies de *Aspergillus*, varía del verde al negro, por ejemplo:

Tabla No (2)

Coloración de las colonias de varias especies de *Aspergillus*.

Especie de <i>Aspergillus</i>	Color
<i>glaucus</i>	verde
<i>clavatus</i>	verde
<i>fumigatus</i>	oscuro
<i>flavus</i>	amarillo
<i>niger</i>	negro

3.- Rhizopus: una de las características de esta especie es la formación de rizoides. Su crecimiento lo realiza en forma de arco sobre el sustrato, formando rizoides los cuales pueden trepar sobre los objetos sólidos. Esta especie presenta esporangióforos no ramificados que se forman en los sitios de desarrollo de los rizoides.

Los esporangios están teñidos de color pardo o negro. La columela por regla general es semiesférica, se encuentra en la extremidad dilatada por los esporangióforos. Las esporas son angulosas y muchas veces están provistas de una membrana con marcados surcos longitudinales. Esta característica diferencia las esporas de Rhizopus de las de Mucor.

Las especies más comunes de Rhizopus son la nigricans, la oryzae y la menos común la delemar. Las diferencias entre cada una de ellas es la siguiente: ver tabla (3)

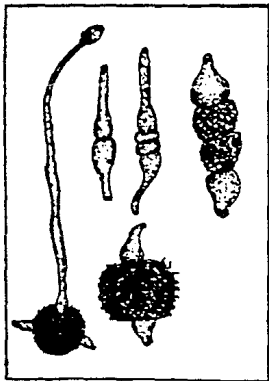
Características diferenciales entre las especies de Rhizopus.

Rhizopus	Color	Tamaño
nigricans	blanco o pardo	100- 350 μ
oryzae	blanco o pardo	50 - 200 μ
delemar	blanco o negro	140- 180 μ

4.- Mucor; los esporangióforos pueden, o no estar ramificados y soportar esporangios terminales, que frecuentemente tienen una coloración oscura, y en algunas especies son tan grandes que se pueden observar a simple vista. La cara externa de la pared del esporangio esta ocupada con frecuencia por cristales de oxalato de calcio, y por lo general la pared es quebradiza. En el género Mucor no se encuentra una epófisis, pero en algunas especies se comprueba la existencia de un cuello. Los esporangióforos son esféricos y elípticos, jamás de forma regular. Los clamidiosporos se presentan en varias especies.

Como contaminante de los cosméticos la especie más importante de éste género es *Mucor mucedo*, la cual tiene un micelio blanquecino, que luego cambia a pardo y luego forma esporangióforos largos y rígidos del mismo color, que miden hasta 10 mm de largo y en la mayoría de los casos no se encuentra ramificado. Los esporangióforos soportan esporangios grandes, esféricos de 100 -200 μ de diámetro, que primero son amarillos, pero que luego se tornan grises y oscuros. Existen otras especies como *Mucor racemosus*, *plumbeum*, *javanicus* y *rouxianus* los cuales casi no se encuentran en preparados cosméticos.

FIGURA (2). *Mucor mucedo*
Formación de zigósporos



5.- *Botrytis cinerea*; éste hongo forma un micelio lanoso, que va del gris al amarillo pardusco, de hifas pruricelulares fuertemente ramificadas.

Sobre un sustrato sólido, las colonias crecen como haces lanosos asfietrados que ascienden desde la superficie y en ciertos casos es muy semejante a las colonias de las especies de *Mucor*, pero son ligeramente más lanosas. No existe ningún micelio aéreo y solo una capa gris de conidióforos que miden aproximadamente 1 mm de altura. Este hongo se desarrolla sobre verduras y frutas en descomposición y en cosméticos se desarrolla en productos que contengan ácidos orgánicos naturales es su formulación.

6.- *Alternaria*; las especies de éste género son reconocidas con facilidad por sus cadenas de grandes conidias de coloración oscura, pluricelulares, en forma de maza, que crece en los extremos de los conidióforos cortos separados, ramificados o no. Existen algunas especies cuyas conidias se encuentran estiradas en forma de pico.

Las colonias que en un principio son incoloras se van haciendo negras como el *Cladosporium*, pero esta coloración es más lenta en *Alternaria*. La especie más común es *Alternaria tenuis*, las conidias marcadamente poliformes y de un color verde olivo oscuro. Aquellas especies en las que no se forma cadena es la especie *stamphylium*, la cual forma conidias por separado.

7.- *Cladosporium*; el micelio es blanco al principio, pero pronto se torna negro. Cuando el hongo crece sobre un sustrato sólido, translúcido, las colonias aparecen negras, cuando se observa desde la cara anterior de la capsula. La cara superior de las colonias esta cubierta por una capa oscura verde olivo, aterciopelada, de conidias y conidióforos. Este hongo posee la propiedad de licuar lentamente la gelatina.

9.- *Cándida*; en 1942 J. Lodder y H.A. asignaron el género *Cándida* a las levaduras esporógenas e incluyeron en éste género numerosas especies que habían estado repartidas entre géneros independientes.

El género *Cándida* está caracterizado por un pseudomicelio bien desarrollado y en algunos casos por un micelio verdadero, aunque también primitivo. Ambas formas miceliarias están provistas de un aparato blastospórico. La multiplicación se produce exclusivamente mediante gemación. Puede producirse clamidosporas. Numerosas especies son capaces de producir una fermentación alcohólica en mosto de cerveza y mosto de vino, como es el caso de *Cándida vulgaris*. Otras especies sobre todo tropicales, son patógenas para las personas como es el caso de *Cándiga albicans*.

9.- Bacterias; es muy poca la información sobre la contaminación de cosméticos por bacterias, pero en los mas recientes estudios se han encontrado varios tipos de bacterias entre las que se encuentran: *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomona*, *E. coli salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium*.

3.5.5 Factores que influyen en el desarrollo de los microorganismos. (18)

Los microorganismos son capaces de soportar sus procesos metabólicos por la utilización de las más diversas fuentes de alimento. No existe la posibilidad de que un solo compuesto orgánico pueda proporcionar todo lo necesario para el desarrollo de un microorganismo, pero si se puede afirmar que existen bacterias que pueden usar compuestos muy simples como subtrato.

Una de las características de los microorganismos es la especialidad que tienen sobre varias fuentes de carbono. Los microorganismos que se han encontrado en cosméticos, no son comunmente problemáticos, pero frecuen---temente, la condición particular en cada tipo de cosmético, favorecerá el desarrollo y reproducción de los microorganismos. Una insignificante di---ferencia en el orden de división, puede causar grandes diferencias en el número de los microorganismos.

Todos los microorganismos requieren de una fuente de energía ya sea radiante o química, cada caso derivado de la oxidación de varios compues---tos.

Todos los microorganismos necesitan un gran número de elementos, nece---sarios para su funcionamiento, los cuales deben de estar presentes en su protoplasma como el fósforo, azufre, hierro, cobre, magnesio, selenio, co---balto y otros elementos además de una fuente de carbono y nitrógeno.

La mayoría de los microorganismos requieren de bioxido de carbono pa---ra su desarrollo. Organismos que pueden usar carbono para su metabolismo a partir solamente del bioxido de carbono son llamados autotróficos. Las bac---terias de esta clasificación incluyen a las fotosintéticas que oxidan: amon---io, nitrito, sulfuro, sulfuro de hidrógeno, tiosulfato, metano y sales fe---rrosas. La mayoría de los microorganismos son aerobios y se pueden encon---trar en cosméticos.

Desde el punto de vista de la cosmética los microorganismos heterotróficos requieren de bióxido de carbono como fuente de energía y de carbono, pero algunas especies requieren fuentes orgánicas de nitrógeno, de sulfuro o ambos. Un solo alimento puede suministrar completamente todo lo necesario. Lo siguiente puede servir como sustrato para microorganismos encontrados en cosméticos:

- 1.- carbohidratos, glicósidos; gomas naturales, mucilagos, pectinas, almidones, dextrinas y azúcares.
- 2.- Alcoholes; glicerol, manitol y alcoholes grasos.
- 3.- Acidos grasos y sus ésteres; grasas animales y vegetales, aceites y merclas.
- 4.- Esteroides; colesterol y aminoácidos.
- 5.- Proteínas; peptonas y aminoácidos.
- 6.- Vitaminas.

En resumen se requieren una fuente de carbono, y una fuente de nitrógeno, que puede ser orgánico y servir como fuente de carbono; como una proteína o compuestos inorgánicos como el amonio, que puede ser el factor entre presencia o ausencia de crecimiento.

A).- Minerales.

Las sales minerales estan siempre presentes en el desarrollo natural de los microorganismos. Los requerimientos de estos materiales son variables y en suma, pueden antagonizar o substituir efectos biológicos. Azufre fósforo, magnesio, potasio, calcio y cloro son requeridos, además de trazas de otros metales como hierro, cobre, zinc y cobalto, un total de 17 elementos son usados y requeridos por hongos y bacterias existiendo ligeras diferencias entre los diferentes grupos de microorganismos.

Un solo sustrato como por ejemplo la gelatina provee, todo lo necesario con respecto a sales minerales, pero además las impurezas ordinarias del agua, proveen las trazas de elementos necesarios para casi todos los microorganismos. Casi siempre el uso de agua desmineralizada reduce la posibilidad del desarrollo de los microorganismos, así mismo con el uso del agua destilada reduce la contaminación de los cosméticos.

Muchas de las sales requeridas por los microorganismos son tóxicas en grandes cantidades. Las sales de cobre han sido utilizadas para prevenir el desarrollo microbiano. Agentes quelantes son capaces de combinarse con los metales formando complejos, reduciendo la concentración además de poseer propiedades germicidas. Un buen ejemplo de éste agente quelante es el E.D.T.A. y el 8-hidroxiquinoleína agente fúngico al cual también se le atribuye esta propiedad. (18)

B). - Vitaminas.

El Término factor de desarrollo es generalmente sinónimo de una vitamina. Las vitaminas B. tiamina, riboflavina, ácido pantoténico, niacina, biotina, piridoxina, ácido fólico, inositol, ácido para amino benzoico y cobalamina, son esenciales para el metabolismo de todos los microorganismos, pero pueden ser sintetizados, a partir de diferentes fuentes. Una deficiencia de tiamina es la causa más común de la falta de los filamentos en los hongos encontrados en forma natural. Los microorganismos comunmente encontrados en cosméticos requieren de una cantidad mínima de los factores de desarrollo. (24)

C). - Contenido de Humedad.

Los microorganismos pueden desarrollarse cuando cuentan con el agua necesaria para mantener su metabolismo. Es de gran importancia conocer la cantidad de humedad requerida para cada tipo de microorganismo. De acuerdo a Block (18) la mayoría de los microorganismos tienen la habilidad de desarrollarse en materiales relativamente secos, con un 1% de humedad.

Un hongo es capaz de obtener la humedad necesaria, por sus micelios desarrollados directamente sobre la atmósfera (excepto a 100% de humedad relativa), pero regularmente proviene del sustrato. Se ha demostrado que los hongos *Alternaria* no pueden desarrollarse en cremas o lociones conteniendo alrededor de 50% de agua. Las bacterias en general requieren un alto contenido de agua en su inmediato desarrollo comparándolo con un hongo hay un rango intermedio para cada especie de organismo dominante.

D).- Influencia del pH.

El pH como un efecto marcado sobre el número y tipo de microorganismos que pueden desarrollarse sobre un sustrato. Los hongos son capaces de desarrollarse por un rango arriba a abajo de un pH de 7 (pH de 4 a 9). Algunos hongos producen ácido y pueden desarrollarse en soluciones ácidas.

Las bacterias comúnmente se desarrollan en medios neutros o ligeramente alcalinos (pH de 6 a 8). En condiciones ligeramente ácidas se favorece el desarrollo de bacterias de ácido láctico. No se han observado organismos que se desarrollen a pH mayores de 10. (22) (23)

TABLA No 4 pH óptimo para el desarrollo de algunas bacterias. (13)

Microorganismo	ácido límite	óptimo	alcalino
<i>B. coli</i> comunis	4.4	6-7	7-8
<i>B. colerae</i>	5.6	6.2-8.0	9.6
<i>B. paratyphus</i>	4.0	6.2-7.2	9.6
<i>B. typhosus</i>	4.0	6.2-7.2	8.7
<i>S. aureus</i>	5.6	7.2-7.6	8.1

E) - Influencia de la temperatura. (18)

La temperatura óptima para el desarrollo de cada organismo, y el rango de temperatura para cada microorganismo es muy estrecha. La temperatura óptima para la gran mayoría de bacterias saprófitas comunes levaduras, y hongos se encuentra en un rango de 20 a 30 °C. Este es un rango de temperatura en la cual casi todos los cosméticos son almacenados y usados, esta temperatura favorece las condiciones óptimas del desarrollo de los microorganismos. Un segundo grupo en gran parte bacterias, tienen una temperatura óptima cercana a los 37 °C. Este grupo contiene especies que viven en animales de sangre caliente y muchos de ellos son patógenos.

Algunos otros microorganismos pueden desarrollarse a temperaturas cercanas a los 0 °C, el orden de multiplicación es extremadamente bajo. Como se sabe el almacenaje de materiales cosméticos en un lugar frío detiene el desarrollo de los microorganismos, además de prevenir la descomposición de los cosméticos. Los cambios de temperatura durante el almacenaje pueden favorecer la formación de pequeñas capas de condensado que favorecen la germinación de esporas. Por otro lado las elevadas temperaturas usadas en la preparación de los cosméticos, puede ejercer un efecto sobre los organismos contaminantes y afectar el número de los microorganismos remanentes.

F) - Influencia del oxígeno. (25)

La presencia de oxígeno, fundamental para el potencial óxido--reducción, tiene una influencia sobre el tipo de los microorganismos que se desarrollan sobre el sustrato. Los microorganismos que no se pueden desarrollar con la presencia de oxígeno son llamados aerobios obligados. El oxígeno puede incorporarse dentro del protoplasma como un hidroxilo aceptor y es reducido en agua en el proceso. Los microorganismos que no pueden desarrollarse en presencia de oxígeno son llamados anaerobios obligados.

Los que prefieren un acceso limitado de oxígeno son llamados microaerofílicos, como es el caso de una bacteria de ácido láctico. Finalmente hay un gran grupo llamado anaerobio facultativo que crece mejor con la presencia de aire, pero pueden desarrollarse en su ausencia si el medio puede proveer el oxígeno necesario.

Las bacterias varían en sus requerimientos de oxígeno. Generalmente los microorganismos responsables de la contaminación de los cosméticos son aerobios, por lo cual es de gran importancia la eliminación de aire en la preservación del desarrollo de los cultivos. El empaque al vacío o en atmósfera inerte es comúnmente usado en la industria de los alimentos, en los cosméticos la protección puede ser por un encajado, plastificado o metalizado de las superficies de los materiales que lo contienen.

G).- Influencia de otros ingredientes. (18).

Otros ingredientes de la formulación pueden no servir como fuente de alimento de los microorganismos, pero puede influenciar su desarrollo. En esta categoría se encuentran los conservadores, también en este grupo se encuentran las sustancias como los alcoholes y glicoles, que en bajas concentraciones sirven como fuentes de carbono y energía, pero disminuyen el desarrollo de los microorganismos si se encuentran en grandes cantidades.

Se sabe que los tensoactivos, generalmente presentes en los cosméticos pueden tener un efecto sobre el tipo de desarrollo de ciertos microorganismos. El efecto favorable de los tensoactivos, es sobre el desarrollo de los microorganismos favoreciendo la adsorción de nutrientes, lo que hace posible que una mínima concentración de nutrientes sea suficiente para el desarrollo de los microorganismos. Caso contrario si se adiciona en grandes cantidades los tensoactivos, tienen un efecto inhibitorio.

Las sales de varios tipos también pueden tener un efecto inhibitorio si se utilizan en grandes cantidades.

3.5.6 Factores que influyen en la actividad del conservador.

Para que un conservador pueda actuar de manera adecuada dentro de la formulación de un cosmético es importante, tomar en cuenta, que la acción de un conservador depende de la actividad biológica intrínseca y de su disponibilidad en la fase acuosa, la cual es influenciada por el pH y por el coeficiente de partición entre la fase acuosa y la oleosa. (18) (26)

A) .- Actividad Biológica de un conservador.

Ferguson (29) demostró que la actividad biológica esta más relacionada con la actividad termodinámica que con la concentración del conservador. Por otra parte Kostenbauder (28) estudió el efecto del solvente en la actividad termodinámica del metil parabeno cuya solución acuosa saturada 0.25g / 100 ml tiene la misma actividad termodinámica que una solución conteniendo una cantidad menor 0.15g / 100 ml. de polietilenglicol al 10 % en agua. Evans (27), tomando en cuenta la solubilidad y la distribución entre las fases de dos ésteres del ácido parahidroxibenzoico, determinó el grado de saturación de la fase acuosa a varias relaciones de aceite y agua en emulsión. Evans llegó a la conclusión que la mezcla de ésteres tiene mayor eficacia que uno solo. Bean y Heman (31) han establecido que en algunos sistemas bifásicos el factor faltante es la concentración del conservador en la interfase O/W, el descubrimiento es muy importante ya que en muchos microorganismos son capaces de destruir sistemas en emulsión actuando en la interfase. Tomando éste criterio la interfase sería una tercera fase donde existe una concentración de microorganismos y agentes activos.

La actividad biológica se puede medir como el tiempo que se requiere para que una concentración dada provoque una mortalidad estandar. En términos matemáticos sigue un proceso cinético de primer orden:

$$-dN/dt = KN \text{ ----- EC (1)}$$

Donde N es el número de microorganismos vivos por ml en un tiempo t, y K es la constante de la tasa de mortalidad. Integrando la ecuación (1) entre la cuenta N_0 en un tiempo $t=0$ y la cuenta N a un tiempo t y convirtiendo a logaritmos naturales nos queda:

$$K = 2.303 / t \ln N_0 / N \text{ ----- EC (2)}$$

El principal impedimento práctico es la presencia de dos fenómenos:

- a) - Fase latente inicial debido al tiempo requerido por el conservador para adsorberse sobre la superficie del microorganismo.
- b) - La presencia de gérmenes resistentes, es decir con una resistencia mayor, que el promedio de la población.

Por tal razón aparece la curva con una marcada prolongación hacia el extremo derecho. Sin embargo determinando la constante de la tasa de mortalidad K a varias concentraciones, es posible calcular el exponente de la concentración del conservador. Bean (31) considera exponente de la concentración como el parámetro más útil de un conservador, y demostró que mientras más bajos son los exponentes de la concentración, la actividad biológica del conservador se ve menos afectada por las pérdidas del sistema.

$$N = \log k_1 - \log k_2 / \log C_1 - \log C_2 \text{ --EC (3)}$$

Donde k_1 es la constante de mortalidad a la concentración C_1 , y k_2 es la constante de mortalidad a la concentración C_2 .

B).- Influencia del pH. (30)(31)(32)

Estudios de preservación con conservadores han probado que no es el pH el mayor responsable de la acción antimicrobiana si no la actividad intrínseca del conservador. Albert (30) 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 esta en función del pH. Garret (32) trató la actividad de los conservadores ácidos débiles en función del pH y desarrolló ecuaciones al respecto:

Si fHA es la fracción de la concentración total del conservador en la forma no disociada.

$$fHA = \frac{(HA)}{(HA) + (A^-)} = \frac{1}{1 + (A^-) / (HA)} \quad (1)$$

Puesto que :

$$K_a = \frac{(H^+) (A^-)}{(HA)} ; (A^-) = \frac{K_a}{(H^+)} \quad (2)$$

Entonces:

$$fHA = \frac{1}{1 + K_a / (H^+)} = \frac{(H^+)}{(H^+) + K_a} \quad (3)$$

Si u es la concentración biológica activa que se requiere, la concentración total del conservador (HA + A⁻) que se necesita es :

$$\begin{aligned} \text{TOTAL} &= u / fHA = u (H^+) + K_a / (H^+) \quad (4) \\ u &= fHA \text{ TOTAL.} \end{aligned}$$

El logaritmo de la constante de disociación K_a con signo negativo es el pKa que numéricamente equivale al 50% del ácido disociado.

Por ejemplo: el ácido benzoico cuya constante de disociación K_a es de 6.3×10^{-5} tiene un valor de pKa= 4.2.

Tabla No (4.1) K_a del ácido benzoico en función del pH. (31) (32).

pH	K_a del ácido benzoico no disociado
4.0	60 %
4.2	50 %
5.0	13 %
6.0	1.5%
7.0	0.15%

Estos valores muestran el bajo rendimiento del poder conservador del ácido benzoico como conservador en condiciones moderadamente alcalinas o que tienden hacia la alcalinidad.

Por ejemplo para el hongo *Aspergillus niger* las concentraciones mínimas inhibitorias (%) de cuatro ésteres del ácido p-hidroxibenzoico es la siguiente:

Tabla No (5) Concentración mínima inhibitoria. (30)

ESTER	pH 5	pH 6.7	pH 9
Metílico	0.09	0.10	0.15
Etilico	0.06	0.06	0.09
Propílico	0.03	0.04	0.05
Butílico	0.02	0.02	0.03

Es conveniente entender que el efecto del pH sobre el conservador modificando su disociación y por consecuencia su actividad, debe sumarse a la toxicidad propia de los iones hidroxilo y de los iones hidronio. Cualquiera solución con un pH menor de 2, o mayor de 10 se preserva por si misma y habitualmente es de rápida acción bactericida.

C).- Influencia del Coeficiente de Partición. (17) (18) (68)

Una emulsión esta formada de:

- 1.- Una fase lipofílica.
- 2.- Una fase acuosa que por lo general contiene el emulsificador. En una emulsión (O/W).
- 3.- Una interfase con el agente coloidal o emulsificador adsorbido.

Bean y sus colaboradores estudiaron dicha distribución y la definieron matemáticamente como:

$$\frac{C_o}{C_u} = K^*u \quad \text{-----} \quad (1)$$

C_o = Concentración del conservador en el aceite.

C_u = Concentración del conservador en el agua.

K*_u = Es el coeficiente de partición (O/W).

Los coeficientes de partición pueden usarse en la siguiente ecuación básica para calcular la concentración del conservador en la fase acuosa y la concentración total en cualquier sistema (O/W).

$$C_u = \frac{C_w (\Delta) - 1}{K^*w (\Delta) + 1} \quad \text{-----} \quad (2)$$

C_w = Es la concentración del conservador en el sistema.

C_u = Es la concentración del conservador en el agua.

O = Es la relación (O/W).

K^u = Es el coeficiente de partición (O/W) del conservador.

Cuando se añade un emulsificador a un sistema simple provoca una redistribución entre las fases debido a la acción solubilizante del emulsificador sobre el conservador, uniéndose parcialmente ocasionando que la concentración del conservador total en la fase acuosa sea la siguiente:

$$C_a = \frac{C_1 [(O) + 1]}{K^u (O) + 1} \quad (3)$$

La concentración libre en el agua es :

$$[C_w = C_a / R] \quad (4)$$

C_w = Es la concentración del conservador libre en el agua.

C_a = Es la concentración total del conservador en la fase acuosa.

R = Es la relación entre el conservador total y el libre.

Una alteración en la temperatura de las emulsiones cambia las actividades antimicrobianas del conservador en la misma forma que las reacciones químicas cambian su velocidad de reacción con el efecto de la temperatura, (Efecto de Arrhenius).

La relación aceite / agua (O/W) de una emulsión es muy importante para cualquier incremento de agua en la formulación, ya que puede disminuir el efecto del conservador y disminuir su preservación

Cuando la constante K^u es menor que 1.0 la mayor parte del conservador se encuentra en la fase acuosa. Cuando la constante es mayor que 1.0, la mayor parte del conservador se encuentra en la fase oleosa, e incrementando el valor de β , la concentración del conservador en la fase acuosa se reduce

De Navarre [74] muestra algunos coeficientes de partición del éster metílico en diversas mezclas de aceite y agua. Bean [31] con los datos formuló el siguiente cuadro sobre el contenido de éster metílico en la fase acuosa de sistemas simples aceite/agua

TABLA No(6). Contenido del éster metílico en sistemas (O/W).

FASE OLEOSA	SOLUBILIDAD DEL ÉSTER 1 P/P	COEFICIENTE DE PARTICION (O/W)
Aceite mineral	0.2	0.3
Sebo	0.6	1.3
Acido Esteárico	0.9	2.4
Aceite de Almendras	1.4	6.0
Lanolina	1.8	8.0
Acido Oleico	2.9	7.0
Oleato Oleico	3.0	10.0
Estearato de Isopropilo	6.3	18.0
Estearato de Butilo	6.5	12.5
Oleato de Isopropilo	6.7	16.0
Oleato de Butilo	7.0	16.0
Estearato de ciclohexanol	8.0	13.0
Miristato de Isopropilo	8.2	18.0
Acetato de Cetilo	9.3	18.0
Acido Ricinoleico	11.9	224.0
Acetoglicerido	12.5	27.0
Alcohol Cetílico	13.6	26.0
Alcohol Oleico	15.8	31.0

IV.- Metodología de la Asociación de Cosméticos Productos para el Tocador y Fragancias (CTFA).

4.1 Introducción.

Con la participación de los laboratorios miembros del Subcomité de Inspección Microbiológica de Productos para el Tocador y Fragancias dependiente de la Asociación de Cosméticos Productos para el Tocador y Fragancias (CTFA), se realizó un estudio sobre la calidad microbiológica de los productos cosméticos y tocador. (33) (34)

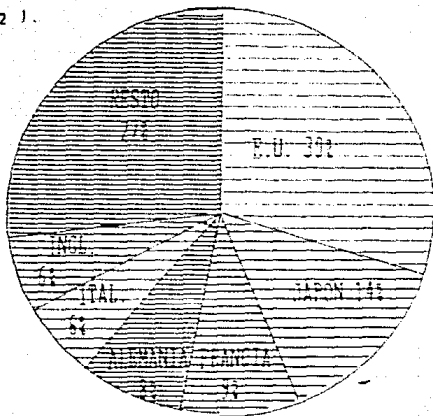
Los miembros de la CTFA representan aproximadamente el 90% del total de volumen de ventas a nivel mundial. Según un estudio de European Trends (79) la clasificación mundial en ventas es la siguiente:

TABLA No (7). Porcentaje total de ventas de cosméticos a nivel mundial.

PAIS	LUGAR	% TOTAL DE VENTAS A NIVEL MUNDIAL.
USA	1°	30%
JAPON	2°	14% EXPORTA EL 3%
FRANCIA	3°	9%
ALEMANIA	4°	8%
ITALIA	5°	6%
INGLATERRA	6°	6%
RESTO DEL MUNDO		27%

Porcentaje (%) del Total Mundial de Ventas de Cosméticos. (7a) (7a)

GRAFICO (2).



La producción del Sector europeo del Este se divide en :

TABLA No (8)

ESPECIALIDAD COSMETICA.	% DEL TOTAL DE VENTAS
Fragancias.	20% se espera un incremento 1987-1990 de un 40%.
Colorantes Cosméticos.	13%
Productos para la piel	22%
Prod. para el cabello.	21%
Desodorantes.	5%
Prod. de higiene oral.	9%

De los países latinoamericanos; Chile, Brasil, Argentina, México, Venezuela y Colombia, son los que registran un mayor número de ventas de cosméticos

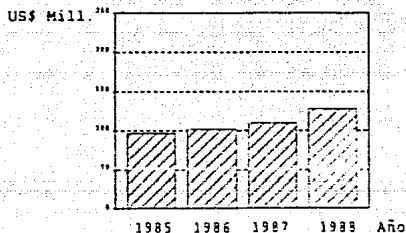
TABLA No (9)

Ventas de Cosméticos en Chile. (77)

Año	US\$ (Millones)
1985	97.4
1986	102.4
1987	110.9
1988	128.4

GRAFICO No (3)

Incremento de ventas de cosméticos en Chile. (77)



Categoría de los productos con más ventas en Chile. (77)

Productos de higiene personal	63.3 % de las ventas
Perfumes	6.6
Cosméticos	26.4
Miscelaneos; removedores, depiladores, toners etc.	3.7%

El estudio realizado por los laboratorios miembros de la CTFA es de gran importancia en la realización de esta tesis, nos da una estimación del contenido microbiano de los productos cosméticos, así como la comparación de métodos microbiológicos de los laboratorios participantes. Este capítulo nos muestra un desarrollo experimental realizado por la CTFA el cual tiene los siguientes objetivos:

1. - Determinar el contenido microbiano de los productos cosméticos.
2. - Determinar la presencia de *S. aureus*, *E. coli*, y *Pseudomona*.
3. - Comparar los distintos métodos usados entre laboratorios participantes y los usados por la CTFA.

La evaluación se realizó con 3,987 productos cosméticos recolectados de tiendas en los Estados Unidos. Para su estudio 21 laboratorios miembros de la CTFA participaron en el proyecto. Cada laboratorario usó su propio método para el estudio microbiológico y se comparó con el método expuesto por el Subcomité de Control Microbiológico.

La evaluación de los cosméticos comienza con una prueba piloto en la que seis laboratorios miembros de la CTFA participan en la prueba para poder eliminar potenciales problemas durante el desarrollo del estudio. Cada laboratorio realiza sus pruebas conforme a sus propios métodos de evaluación microbiológica. Por otra parte la CTFA realiza la misma prueba utilizando su propia metodología.

4.2 Métodos microbiológicos usados por los laboratorios miembros de la CTFA

A) - Metodología de la CTFA: (31) (35)

1. - Pesar 10g o colocar 10ml de producto cosmético.
2. - Diluir la muestra con 100ml de peptona al 0.1% en agua, para emulsiones aceite en agua, mezclar con 10ml de polisorbato 80 y diluir con 100ml de agua peptonada.
3. - Tomar 0.1ml de la alicueta y sembrarlas en placas de agar soya y trip--ticaseína con polisorbato 80 al 5% y lecitina al 0.7%.
4. - Incubar a 35 °C por dos días. La presencia de *E. coli*, *P. aureginosa* y *S. aureus* fué determinada usando la metodología de la USP XXI.

B) - Para describir los métodos usados por los demás laboratorios se presenta la siguiente tabla:

Métodos usados por los laboratorios miembros de la CTFA.

TABLA No 1107

METODO DEL LABORATORIO	DILUYENTE	ENRIQUECIDO	MEDIO EN PLACA
AVON	Caldo lactosado.	si	BHIA
L'ORÉAL	Agua peptonada	NO	PDA
CLAIROL	Agua peptonada con 2% de polisorbato y 0.07 de lecitina.	Sólo para productos para ojos.	LA MA TSA_LT
MAX FACTOR	0.1% de polisorbato en solución salina.	NO	SA
REVLON	Agua o 10% de polisorbato en agua	NO	SA
LEVER BROS.	Caldo lactosado con 1.5% de polisorbato 80	si	PCA

Medios:

BHA	Agar de infusión de cerebro y corazón.
PDA	Agar papa dextrosa.
TSA-LT	Agar soya tripticasesina con polisorbato 80 y lecitina.
LA	Agar lactosa.
MA	Agar micológico.
SA	Agar para sembrar.
PCA	Placa de agar para conteo.

4.3 Prueba Piloto.

Para la prueba piloto fueron recolectados del mercado 90 productos de los cuales 78 de las muestras fueron consideradas como no hostiles y 13 como hostiles (incapaces de dar vida a células vegetativas). Las preparaciones fueron clasificadas de acuerdo a la descripción de la CIPA.

Tabla No (11) Muestras para la prueba piloto.

CATEGORIA	No DE MUESTRAS
Preparaciones para el baño.	1
Preparaciones para los ojos.	13
Fragancias.	4
Preparaciones para el cabello.	28
Tintes para el cabello.	1
Preparados para maniquiere.	1
Preparados para el aseo personal.	4
Preparados para afeitarse.	1
Preparados para la piel.	31
Otros preparados.	<u>1</u>
TOTAL	90

4.4 Resultados de la prueba piloto.

Para la prueba 54 muestras fueron sembradas utilizando los métodos de los laboratorios participantes, y 13 por el método de la CTFA, además 24 de las muestras se examinaron por ambos métodos.

Del total de las 54 muestras sembradas, solamente en 4 placas existió crecimiento: 3 placas contenían alrededor de 700 colonias/gramo de muestra y 1 contenía más de 1000 colonias/gramo. Los microorganismos encontrados fueron bacilos Gram (+). El pequeño número de muestras positivas nos da una idea de la efectividad de los métodos en placa.

El posible efecto inhibitorio del producto sobre el contenido del microorganismo fue determinado utilizando controles de *S. aureus*, *P. aureginosa* o ambas. Se encontró que la primera dilución, de la muestra nulifica todo posible efecto inhibitorio.

Comparando los métodos en placa usando medios enriquecidos a un nivel de 10^{-1} se obtienen los siguientes resultados:

TABLA No (12)

Comparación de los métodos en placa enriquecidos.

PROCEDIMIENTO	No DE MUESTRAS
Enriquecido	10
No Enriquecido	1
Sin desarrollo usando ambos métodos.	32
Muestras positivas usando ambos métodos.	2
<u>TOTAL DE MUESTRAS</u>	<u>45</u>

Los medios enriquecidos son los más efectivos en la determinación de un mayor número de microorganismos en los productos cosméticos. Las placas positivas, muestran la presencia en 6 de ellas de bacilos Gram (+), y en 5 cocos Gram (+). *S. aureus*, *E. coli* y *Ps. aeruginosa* no fueron encontrados en las preparaciones.

4.4.1. Normas de la CTFA. (33).

Los criterios de calidad fueron basados en las normas de control microbiológico de la CTFA que son las siguientes:

PRODUCTOS PARA BEBER. -----	No más de 500 M.O. / g ó ml
PRODUCTOS USADOS EN	
EL AREA DE LOS OJOS -----	No más de 500 M.O. / g ó ml
PRODUCTOS DE USO ORAL -----	No más de 1000 M.O. / g ó ml.
PARA TODOS LOS PRODUCTOS -----	No más de 1000 M.O. / g ó ml.

4.5 Conclusiones de la prueba piloto.

- 1.- *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* no fueron encontrados en las preparaciones.
- 2.- El 99% de los productos recolectados cumplieron con las normas de control microbiológico propuesto por la CTFA.
- 3.- El 84% de los productos se encontraron libres de microorganismos.
- 4.- Un insignificante nivel de microorganismos inocuos fueron encontrados en el 15% de las preparaciones.
- 5.- Un 1% de los productos recolectados contenían más de 1000 M.O. / gramo.

4.6 PRUEBA GLOBAL.

En la prueba global participaron 17 compañías en diferentes ciudades de los E.U. las cuales son las siguientes:

Clairel Inc., Stamford, Conn.
Bristol-Myers Products, Hillside, N.J.
Max Factor & Co., Hollywood, Calif.
Chesembrogh-Fonds, Inc., Trumbull, Conn.
Revlon, Inc., Suffern, New York
Lanvin, Charles of the Ritz, Holmdell, N.J.
The Gillette Co., St. Paul, Minn.
Menley & James., Philadelphia, Pa.
The Mennen Co., Morristown, N.J.
Avon Products, Inc., Suffern, New York.
Lehn & Fink Prod. Co., Motvale, N.J.
Colgate-Palmolive Co., Piscataway, N.J.
Procter & Gamble Co., Cincinnati, Ohio.
Bonne Bell Cosmetics, Lakewood, Ohio.
Lever Bros., Edgewater, N.J.
Afta Corp., Ada, Michigan.
Faberge, Inc., Redgefield, N.J.

Para el estudio 3,307 productos fueron recolectados en todo el país. Cada muestra contiene una información básica: categoría del producto, fecha y lugar de compra.

El contenido microbiano fue determinado utilizando los procedimientos normales de cada compañía. Para muestras con más de 20 M.O. / gramo de producto, fueron repetidas usando los procedimientos recomendados por la CIPA ver [4.7].

Para las muestras positivas, se realizaron pruebas específicas para determinar la posible identificación de *S. aureus*, *E. coli* y *Ps. aeruginosa*. Para el estudio de los cosméticos fueron clasificados de acuerdo al uso y categoría ver (3.4).

4.7 Resultados Globales.

1.- Tabla (13). Es la suma de los conteos microbiológicos obtenidos de un total de 3,967 muestras en 11 categorías de productos. Los datos son agrupados de acuerdo a las especificaciones de la CTFA ver (4.4.1).

La cantidad de productos cosméticos que se aplican en el área de los cosméticos para bebé muestreados suman 462 muestras de los cuales el 100% se encontraron dentro de las especificaciones de la CTFA. Para las demás preparaciones que suman 3505 muestras el 99.5% quedaron dentro de las especificaciones de la CTFA. El 0.5% restante que representa 17 muestras fuera de especificación mas de 1000 M.O./g de producto:

- a).- 3 productos para el cabello.
- b).- 1 producto para maquillaje.
- c).- 5 productos para la higiene oral.
- d).- 1 preparación para afeitarse.
- e).- 6 productos para la piel.
- f).- 1 cosmético de nueva especialidad.

17 MUESTRAS.

2.- Tabla (14). En esta tabla se clasifican todos los productos por formulación de acuerdo a (3.4). Los resultados indican que de las 17 muestras que salieron fuera de especificación el 10.7% de muestras por formulación con un contenido microbiológico mayor a 20 M.O./g correspondió a los polvos, siendo éstos los que presentaron mayor problema de contaminación, siguiéndole las emulsiones con 1.6%, las soluciones y geles con un 1.7%, los sólidos con 0.3% y finalmente los aerosoles con 0%.

3.- Tablas de la (15-28). Es una lista detallada de todos los productos clasificados por formulación y categorías; para muestras con un contenido microbiano mayor de 20 M.D./g de producto.

4.- Tabla (29). Es la cantidad total de muestras positivas mayores de 20 M.D./g por categoría de producto. En esta tabla se observa que los productos con un mayor índice de contaminación, son los productos: para la higiene oral, los productos para afeitar, las fragancias, los productos para bebe, y los maquillajes. Por otra parte, los que tuvieron un menor índice de contaminación fueron: los cosméticos para los ojos, preparaciones para el cabello, preparaciones para uñas, productos para la piel, especialidades y por último las preparaciones de limpieza.

5.- Tabla (30). Es el resumen de la cantidad y tipo de microorganismos encontrados en las muestras de cosméticos. De los 3 microorganismos señalados como patógenos: *S. aureus*, *E. coli* no fueron encontrados en cantidades significantes más de 20 M.D./g, pero si fué encontrada *P. aeruginosa* en dos muestras; en un risador de cabello y en un gel para afeitar. En los cuales se encontró en un número muy elevado (mas de 1000 M.D./g) el número excede la norma de la CIFA.

La investigación no requirió la identificación de todos los microorganismos encontrados en las 94 muestras, pero la vasta mayoría de los microorganismos encontrados fueron inocuos, bacilos y cocos Gram , esporulados y mohos.

Resumen del contenido microbiano para todos los tipos de productos.

TABLA No (13)

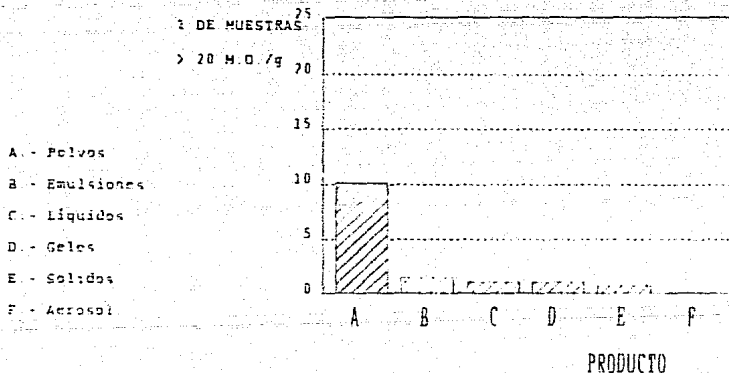
CATEGORIA DEL PRODUCTO.	No MOEST	<20	20 a	100 a	500 a	>1000	% DE LA NORMA
		NEG	100	500	100		
1. - PRODUCTOS PARA BEBE.	165	159	3	3	0	0	100
2. - COSMETICOS PARA LOS OJOS	297	290	6	1	0	0	100
SUB TOTAL	462	449	9	4	0	0	100
(2)	(100)	97.2	1.9	0.9	0	0	CTFA <500/g

3. - FRAGANCIAS	423	404	12	7	0	0	100
4. - PREPARACIONES PARA EL CABELLO	950	939	4	2	2	3	99.7
5. - MAQUILLAJES.	615	596	12	5	1	1	99.8
6. - PREPARACIONES PARA LAS UÑAS	57	51	0	0	1	0	100
7. - PRODUCTOS PARA LA HIGIENE ORAL	99	91	2	0	0	5	94.9
8. - PRODUCTOS PARA LA LIMPIEZA PERSONAL	322	321	1	0	0	0	100
9. - PREPARACIONES PARA AFEITARSE	189	103	4	1	0	1	99.1
10. - PRODUCTOS PARA EL CUIDADO DE LA PIEL	776	762	4	3	1	6	99.4
11. - ESPECIALIDADES COSMETICAS	160	157	1	1	0	1	99.4
SUB TOTAL	3505	3424	40	19	5	17	99.5
TOTAL	3967	3873	49	23	5	17	CTFA <1000/g

TABLA (14) RESUMEN DEL CONTENIDO MICROBIANO PARA TODAS LAS FORMULACIONES

Tipo de Formulación	TOTAL	< 20 (INEG)	20-100	100-500	500-1000	> 1000	% DE MUESTRAS CON MAS DE 20 M
Polvos	481	432	30	13	2	4	10.2
Emulsiones	1693	1656	13	7	1	6	3.6
Líquidos	1140	1126	4	3	1	6	1.2
Geles	167	165	0	0	1	1	1.2
Sólidos	249	247	2	0	0	0	0.8
Aerosol	247	247	0	0	0	0	0.0
TOTAL	1967	1973	49	23	5	17	2.4

GRAFICO (14) TIPO DE FORMULACION V.S. EL % DE MUESTRAS CON MAS DE 20 M.O./g



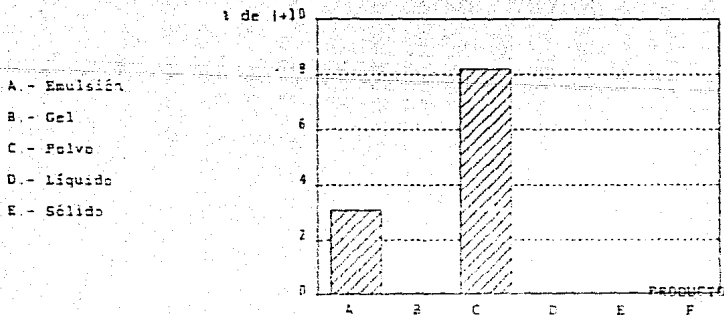
Índice de muestras con un contenido microbiano mayor de 20 bacterias por gramo (positivo), y menos de 20 bacterias por gramo (negativo) para cada formulación y para todas las categorías de productos.

1.- Productos para bebé.

TABLA (15) MUESTRAS POSITIVAS POR CATEGORIA DE PRODUCTO.

Categoría del Producto.	Número de muestras (+/-).				
	A CAMPESIN	B PREESTERILIZADO	C OTRO PRODUCTO	TOTAL	ÍNDICE TOTAL
Emulsión	0/2	1/59	1/5	2/65	3.1
Gel	-	0/2	-	0/2	0.0
Polvo	0/1	4/48	-	4/49	8.2
Líquido	0/23	0/9	0/4	0/36	0.0
Aerosol	-	-	-	-	-
Sólido	-	0/2	0/5	0/7	0.0
TOTAL	0/26	5/113	1/14	6/153	3.6/96

GRAFICO (15) CATEGORIA DEL PRODUCTO V.S. EL % DE MUESTRAS POSITIVAS.

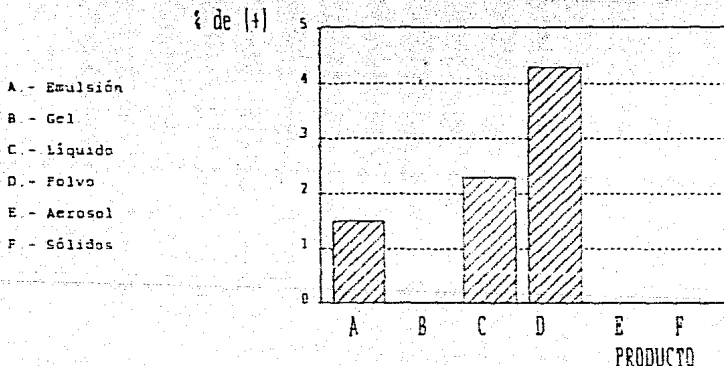


2.- Cosméticos para los ojos.

TABLA (16) MUESTRAS POSITIVAS POR CATEGORIA DE PRODUCTO

Categoría del Producto.	Número de muestras (+/-).					
	A LAPIS PARA OJOS	B LACIUM	C LUMERAL	D MASTIPAR	TOTAL	% DEL TOTAL
Emulsión	0/3	0/3	1/68	1/55	2/129	1.5
Gel	-	-	0/4	-	0/4	0.0
Líquido	-	0/1	0/14	1/28	1/43	2.3
Polvo	0/1	-	4/87	0/5	4/93	4.3
Aerosol	-	-	-	-	-	-
Sólidos	0/3	-	0/18	-	0/21	0.0
TOTAL	0/7	0/4	5/191	2/88	7/290	2.4/97.6

GRÁFICO (6) CATEGORIA DEL PRODUCTO VS EL % DE MUESTRAS POSITIVAS

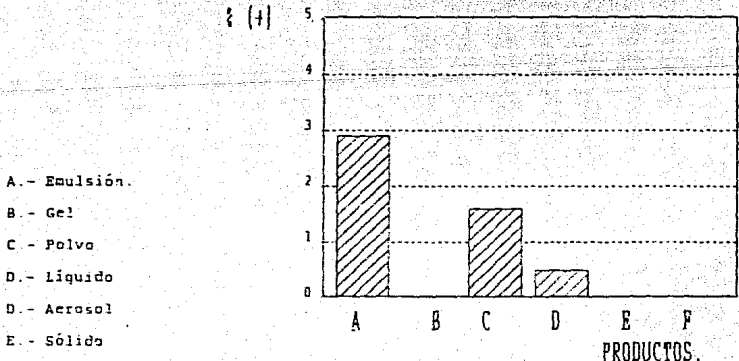


3.- Fragancias.

TABLA (17) MUESTRAS POSITIVAS POR CATEGORIA DE PRODUCTO.

Categoría del Producto.	Número de muestras (+/-).								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Emulsión	0/5	0/4	0/7	1/2	0/10	-	0/6	1/34	2.9
Gel	0/2	0/4	0/1	-	-	-	0/6	0/13	0.0
Polvo	0/7	2/13	0/71	-	-	15/85	-	17/106	1.6
Líquidos	1/54	0/23	0/73	0/35	0/1	-	0/8	1/194	0.5
Aerosoles	0/2	-	0/32	0/12	-	0/1	-	0/47	0.0
Sólidos	0/5	0/1	0/1	0/2	-	-	0/1	0/10	0.0
TOTAL	1/75	2/45	0/115	1/51	0/11	15/86	0/21	19/404	4.5/95.5

GRAFICO (17) CATEGORIA DEL PRODUCTO V.S. EL % DE MUESTRAS POSITIVAS.



4.- Preparaciones para el cabello.

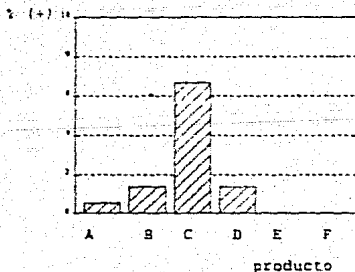
TABLA (18) MUESTRAS POSITIVAS POR CATEGORIA DE PRODUCTO.

Categoría del Producto.	Número de muestras (+/-).											
Emulsión	0/10	1/100	0/18	0/1	0/5	0/7	0/14	0/55	0/72	1/45	0/8	0/9
Gel	0/1	0/2	0/1	-	-	-	-	-	0/8	1/47	0/7	0/4
Polvo	0/8	0/1	0/3	0/1	2/5	-	0/11	-	-	0/1	-	-
Líquido	0/29	0/49	0/44	0/2	0/6	0/10	0/19	1/59	5/162	0/26	0/8	0/8
Aerosol	-	0/1	0/2	0/58	-	0/1	0/7	0/2	-	0/5	0/3	0/1
Sólido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/7	-	-

TABLA (19) % DE MUESTRAS POSITIVAS

PRODUCTO	TOTAL	% DE MUESTRAS +
A. - Emulsión	7/341	0.58
B. - Gel	1/70	1.4
C. - Polvo	2/30	6.7
D. - Líquido	6/421	1.4
E. - Aerosol	0/75	0.0
F. - Sólido	0/7	0.0

GRAFICO (19) CATEGORIA DEL PRODUCTO V.S. EL % DE MUESTRAS POSITIVAS



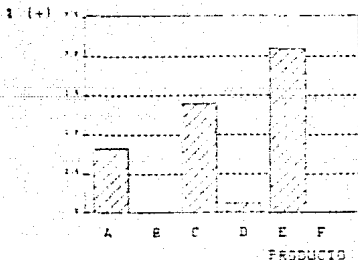
5.- Maquillajes.

TABLA (20) MUESTRAS POSITIVAS POR CATEGORIA DE PRODUCTO.

Categoría del Producto.	Número de muestras (+/-)									
	A. MUESTRAS A POLVOS FACIALES Y CASH PARA O POSITIVAS PARA A LATEX CAS			F. GELAS / POLICRISTALINOS O DEDOS			TOTAL	% DEL TOTAL		
	MAQUILLAJE	CONFE								
Emulsiones	0/54	0/7	0/74	0/7	0/70	0/55	0/10	2/77	2/740	0.83
Gels	0/70	-	0/1	--	0/4	0/1	-	0/4	0/30	0.0
Polvos	3/13	10/68	0/9	-	0/1	0/7	-	1/7	14/100	1.4
Líquidos	0/9	0/7	0/53	-	-	0/23	0/4	1/32	1/123	0.13
Sólidos	0/11	0/1	0/3	0/1	0/66	0/6	1/3	2/4	2/95	2.1
Aerosol	-	-	0/7	-	-	-	0/1	-	0/8	0.0
TOTAL	3/107	10/73	0/47	0/3	0/91	0/97	0/15	6/70	19/596	2.9/97

TABLA (21) % DE MUESTRAS POSITIVAS GRAFICO (19) CATEGORIA DEL PRODUCTO
V S. EL % DE MUESTRAS POSITIVAS

PRODUCTO	% DE MUESTRAS (+)
A. - Emulsión	0.83
B. - Gel	0.0
C. - Polvos	1.4
D. - Líquidos	0.13
E. - Sólidos	2.1
F. - Aerosol	0.0

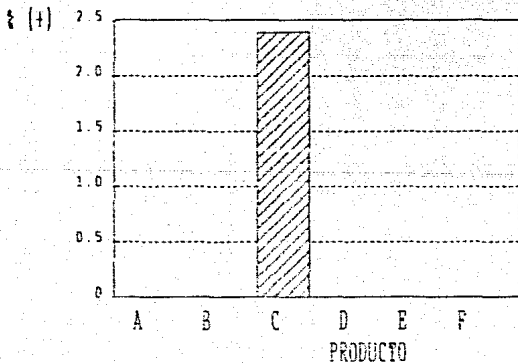


6.- Preparaciones para las uñas.

TABLA (72) MUESTRAS POSITIVAS POR CATEGORIA DE PRODUCTO

Categoría del Producto	Número de muestra (+/-).					
	A. DERMES	B. EMPLASTADOS DE CUTIS	C. LACIUMES	D. VERNES	TOTAL	% DEL TOTAL
Emulsiones	-	0/3	0/4	0/2	0/5	0
Céles	-	-	-	-	-	-
Pólvos	-	-	-	-	-	-
Líquidos	0/7	1/3	-	0/36	1/41	2.4
Aerosoles	-	-	-	-	-	-
Sólidos	-	0/1	-	-	0/1	0
TOTAL	0/2	1/7	0/4	0/38	1/51	1.9/98.1

GRAFICO (10) CATEGORIA DEL PRODUCTO Y % DE MUESTRAS POSITIVAS.



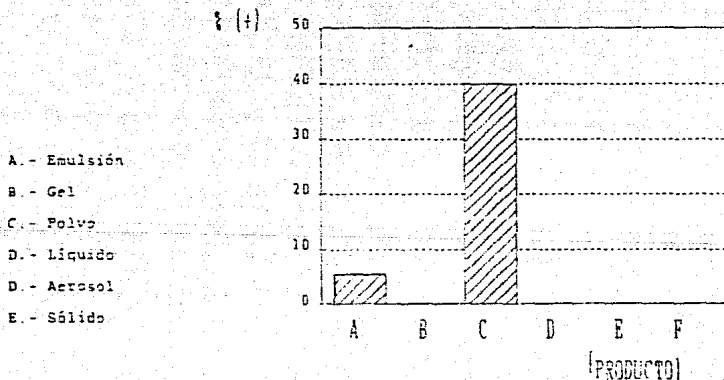
C.- líquidos.

7.- Productos para la higiene oral.

TABLA (73) MUESTRAS POSITIVAS POR CATEGORIA DE PRODUCTO.

Categoría del Producto.	Número de muestras (+/-).				
	A EMULSIONES	B GELACIONES GATALES	F STICKS	TOTAL	% DEL TOTAL
Emulsiones	2/46	-	1/7	3/53	5.7
Géles	0/1	-	0/1	0/2	0.0
Pólvos	2/7	-	3/3	4/10	40.0
Líquidos	0/1	0/21	0/2	0/24	0.0
Aerosoles	0/1	-	-	0/1	0.0
Sólidos	-	-	0/1	0/1	0.0
TOTAL	4/56	0/21	3/14	7/91	7.7/92.9

GRAFICO (11) CATEGORIA DEL PRODUCTO V % DE MUESTRAS POSITIVAS

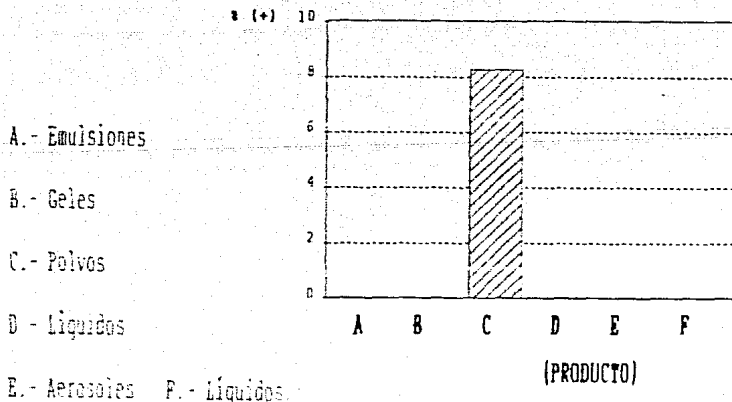


8.- Productos para la limpieza personal.

TABLA (24) MUESTRAS POSITIVAS POR CATEGORIA DE PRODUCTO.

Categoría del Producto.	Número de muestras (+/-)						
	A MUESTRAS PLANTAS	B TUBOS Y INTERCONEXIONES	C DEFENSIVAS	D MUESTRAS	E MUESTRAS	F TOTAL	% DEL TOTAL
Emulsiones	0/70	0/1	0/3	-	0/1	0/30	0.0
Geles	-	0/3	0/3	-	0/3	0/9	0.0
Polvos	0/7	-	1/1	0/2	0/2	1/12	8.3
Líquidos	0/52	0/2	0/32	0/18	0/1	0/105	0.0
Aerosoles	0/49	-	0/22	0/1	-	0/72	0.0
Sólidos	0/11	0/64	0/14	0/1	0/3	0/93	0.0
TOTAL	0/139	0/70	1/80	0/22	0/10	1/321	0.3/99.7

GRAFICO (12) CATEGORIA DEL PRODUCTO V S. EL % DE MUESTRAS POSITIVAS.

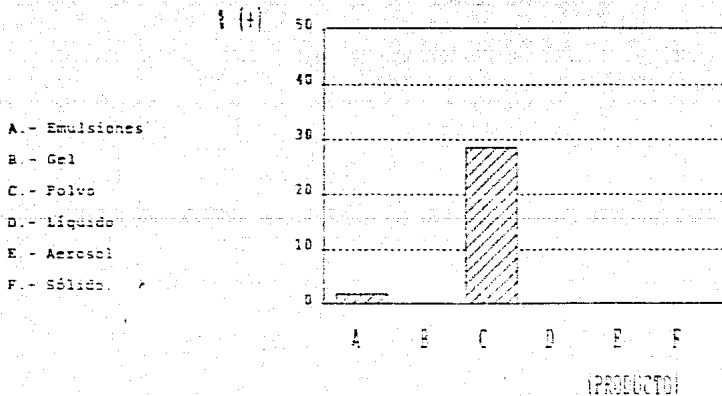


9.- Preparaciones para afeitarse.

TABLA (25) MUESTRAS POSITIVAS POR CATEGORIA DE PRODUCTO

Categoría del Producto.	Número de muestras (+/-)						
	A	B	C	D	E	F	TOTAL
Emulsiones	0/14	-	1/29	-	0/4	1/47	2.1
Gel	-	-	0/1	-	-	0/1	0.0
Polvo	-	4/13	-	-	0/1	4/14	28.6
Líquido	0/12	-	-	-	-	0/12	0.0
Aerosol	-	-	0/27	-	0/1	0/28	0.0
Sólidos	-	-	-	0/2	-	0/2	0.0
TOTAL	0/26	4/13	2/56	0/2	0/6	6/103	5.5/9

GRAFICO (13) CATEGORIA DEL PRODUCTO V % DE MUESTRAS POSITIVAS



10.- Productos para el cuidado de la piel.

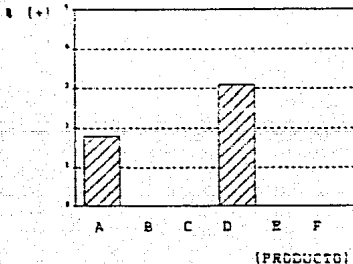
TABLA (26) MUESTRAS POSITIVAS POR CATEGORIA DE PRODUCTO

Categoría del Producto.	Número de muestras (+/-).							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Emulsión	1/176	0/32	6/146	0/2	0/7	2/175	2/23	0/47
Gel	0/7	-	0/3	-	-	0/8	-	0/13
Polvos	-	-	0/3	0/8	-	-	0/1	0/2
Líquidos	2/48	-	0/12	0/1	0/2	1/13	0/1	0/20
Aerosol	0/2	0/1	-	-	-	0/3	-	-
Sólidos	0/3	0/1	0/1	-	-	-	-	0/1
TOTAL	3/236	0/34	6/165	0/11	0/9	3/199	2/25	0/83

TABLA (27) TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS POR PRODUCTO.

PRODUCTO	TOTAL	% (+) TOT.
A.- Emulsión	11/608	1.8
B.- Gel	0/31	0.0
C.- Polvos	0/14	0.0
D.- Líquidos	3/97	3.1
E.- Aerosol	0/6	0.0
F.- Sólidos	0/6	0.0
TOTAL	14/762	1.8/98.2

GRAFICO (14) CATEGORIA DEL PRODUCTO V.E EL % DE MUESTRAS POSITIVAS

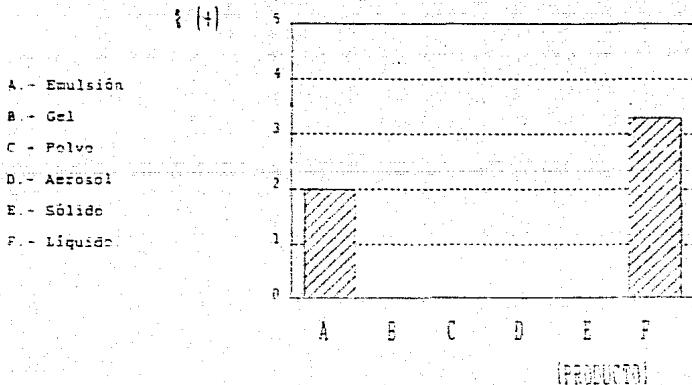


11.- Especialidades Cosméticas.

TABLA (28) MUESTRAS POSITIVAS POR CATEGORIA DE PRODUCTO.

Categoría del Producto.	Número de muestras (+/-)					TOTAL	% DEL TOTAL
	A	B	C	D	E		
Emulsiones	0/3	0/21	2/71	0/5	2/100	2	
Gel	-	0/2	0/2	-	0/4	0.0	
Polvo	0/3	-	-	-	0/3	0.0	
Aerosol	0/1	0/6	-	0/3	0/10	0.0	
Sólidos	0/4	-	0/4	0/1	0/3	0.0	
Líquido	1/9	0/12	0/6	0/3	1/30	3.3	
TOTAL	1/20	0/41	2/83	0/12	3/157	1.9/99	7

GRAFICO (15) CATEGORIA DEL PRODUCTO Y % EL % DE MUESTRAS POSITIVAS.

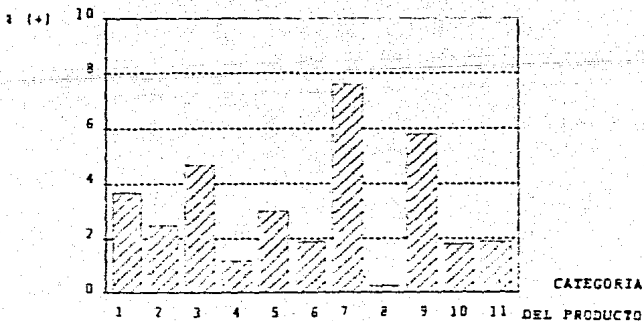


Cantidad total de muestras positivas (>10 M.C./g) de producto.

Tabla No (29)

Categoría del producto	# Del total	% De positivas.
1.- Productos de bebé.	3.6/96.4	3.7
2.- Cosm. para ojos.	2.4/97.6	2.5
3.- Fragancias.	4.5/95.5	4.7
4.- Prep. para cabello.	11/93.9	1.2
5.- Maquillajes.	15/59.6	3.0
6.- Prep. para añas.	19/98.1	1.9
7.- Prod. Higiene oral.	7.1/97.9	7.6
8.- Prep. Limpieza.	0.3/99.7	0.3
9.- Prep. de afeitar.	5.5/94.5	5.8
10.- prod. Para la piel.	1.8/98.2	1.8
11.- Especialidades.	2.9/98.1	1.9
TOTAL	94/3873	2.4

Categoría del Producto V.S. % Mts. Positivas. Gráfico (16)



Tipos de microorganismos encontrados en placas positivas (94 de 3967).

TABLA No (38).

TIPO DE M.O.	TOTAL	20 a 100	100 a 500	500 a 1000	>1000	CLAS.
1.- S. aureus.	0	-	-	-	-	-
2.- E. coli	0	-	-	-	-	-
3.- Ps. aeruginosa	2	0	0	0	2	L.G
4.- No IDENTIFICA- DOS	77	17	4	1	5	L.F.P.E
5.- ESPORULADOS (GRAM.)	10	3	2	0	0	P.E
6.- Bacilos (GRAM.)	22	9	3	1	4	P.E
7.- CORINEBACTERIA	2	1	1	0	0	P.E
8.- MOHOS	11	6	4	1	0	P.E
9.- COCCOS (GRAM +)	3	2	1	0	0	P.E
10.- COCCOS (GRAM -)	1	0	0	1	0	P.E
11.- KLEBSIELLA	1	0	0	0	1	E
12.- PSEUDOMONAS	2	0	0	0	2	L.E
13.- PROTEUS	1	0	1	0	0	L.P
14.- ENTEROBACTER	1	0	0	0	1	L
15.- SERRATIA	1	0	0	0	1	L
16.- BACTERIAS NO IDENT. Y MOHOS	7	4	2	1	0	L.E
17.- BACILO GRAM -	1	0	0	0	1	F
18.- BACILOS GRAM + COCCOS Y MOHOS	1	1	0	0	0	L.E.P
19.- COCCOS Y CORINE BACTERIA	1	1	0	0	0	
TOTAL	94	49	23	5	17	

L- LIQUIDOS. P- POLVOS E- EMULSIONES G- GELES.

4.8 Conclusiones de la prueba global.

1.- La prueba realizada por la CTFA indica que los cosméticos muestreados en el mercado de los E.U. pueden ser considerados como productos limpios aunque no estériles.

2.- El 99.5% de los cosméticos muestreados quedan dentro de las normas de la CTFA ver (4.4.1).

3.- El 100% de los productos para bebé, y los productos que se aplican en el área de los ojos quedaron dentro de norma, menos de 500 M.O./g de muestra.

4.- Las restantes muestras recolectadas 3,489 de los 3,505 quedaron dentro de norma, para los cosméticos de uso general 1000 M.O./g de muestra. Los resultados confirman la efectiva preservación de los cosméticos, así como la baja incidencia de microorganismos patógenos.

V.- PROYECTO TENTATIVO DE TECNICA PARA EL CONTROL MICROBIOLOGICO DE COSMETICOS EN MEXICO.

5.1 MANEJO DE LAS MUESTRAS. (36) (37) (38).

Cada muestra deberá contener la siguiente información básica:

- A).- Categoría y tipo de producto.
- B).- Fecha y lugar de compra.
- C).- Nombre del producto y de la compañía que lo fabrica.
- D).- Número del registro de Salubridad.
- E).- Contenido en unidades del sistema métrico decimal.
- F).- Identificación del lote de fabricación (número, letra o cualquier otra señal).
- G).- Formulación, siempre y cuando así lo indique la Secretaría de Salud.

5.2 MUESTREO.

Para decidir sobre la aceptación de un lote motivo de una transacción comercial, tomar al azar 12 unidades de producto por cada lote de fabricación, las que se dividen en tres grupos de cuatro unidades. Un grupo se destina para el fabricante, otro para el comprador y el restante se guarda para tercería en su caso. (34)

5.3 CRITERIO DE ACEPTACION.

Si al probar las unidades de producto que corresponden a uno de los grupos, una o más de estas unidades no cumplen con las especificaciones de la Secretaría de Salud, el proveedor y/o el fabricante pueden exigir que se pruebe el grupo correspondiente a la tercería la cual decide en forma definitiva la aceptación o rechazo del lote inspeccionado. (21) (34)

5.4 DEFINICIONES.

Ver anexo (I) al final de la tesis.

5.5. NORMA DE LA SECRETARIA DE SALUD PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS. (12)

La norma sobre control microbiológico publicada en el Diario Oficial el lunes 18 de enero de 1988 establece lo siguiente:

Artículo 1245.- Los límites microbiológicos permitidos para los productos terminados son los siguientes:

I MICROORGANISMOS AEROBIOS:

No más de 500 colonias / g ó ml en los productos para niños y para aplicación en el área de los ojos.

No más de 1000 colonias / g ó ml para todos los productos.

II HONGOS Y LEVADURAS:

No más de 100 colonias / g ó ml de la muestra.

III Ausencia de *Escherichia coli*.

IV Ausencia de *Salmonella* sp.

V Ausencia de *Pseudomonas* sp.

VI Ausencia de *Staphylococcus aureus*.

VII Ausencia de *Cándida albicans*. (próximamente será incluida).

5.6 METODOS DE PRUEBA.

5.6.1 Dilución de la muestra.

El primer paso consiste en proporcionar una serie de condiciones bajo las cuales cada unidad microbiológica viva presente en el material, pueda desarrollar una colonia discreta pero visible. Para tener un número de colonias fáciles de contar, con frecuencia es necesario diluir el material de ensayo, con un diluyente que no afecte a los microorganismos. Una alícuota de la dilución resultante se distribuye sobre un medio sólido y se lleva a la estufa de cultivo. Conforme al número de colonias que se producen y dado que se conoce la dilución efectuada y el volumen de la alícuota se puede calcular la cantidad de microorganismos por unidad de peso o de volumen del material. (16) (36) (38)

5.6.2 Neutralización del conservador. (16) (39) (41) (42)

La gran mayoría de los materiales que ingresan al laboratorio de control microbiológico se hallan protegidos por conservadores y por lo tanto, antes de efectuar la prueba para la cuenta de microorganismos, debe neutralizarse el conservador lo que se hace incorporando un agente apropiado:

- a). - Si se trata de parabenos o compuestos fenólicos, se emplea preferentemente el polisorbato 80 al 0.1%.
- b). - Si el conservador es un compuesto de amonio cuaternario se prefiere Cirasol ALM-WF en concentración de hasta el 1%.
- c). - Si se trata de formaldehído, se neutraliza con dioxeta 0.01-0.05%.
- d). - Para otro tipo de conservadores puede utilizarse el neutralizante universal Merckina 2.1% y polisorbato 80 al 1%, éste último se utiliza.

cuando se desconoce el tipo de conservador o cuando los otros neutralizantes no han dado resultado. Al final de esta tesis se encuentra una lista más completa de conservadores y sus respectivos neutralizantes ver el anexo II

En la determinación microbiológica de los productos preservados pueden existir varias causas de error, las cuales son las siguientes:

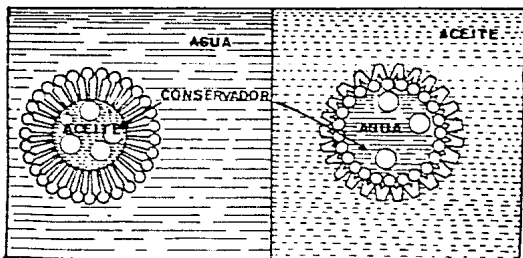
- A) - El uso correcto o insuficiente del neutralizador.
- B) - Un uso excesivo del agente neutralizante puede causar una actividad intrínseca antimicrobiana o afectar las propiedades de recuperación del sistema y hacerlo incompetente para el desarrollo de los microorganismos.

5.6.2.1 Teoría de la Neutralización del Conservador. (41)

En los últimos años se ha investigado el mecanismo por el cual actúan los neutralizantes sobre los conservadores, encontrándose tres maneras distintas las cuales son las siguientes:

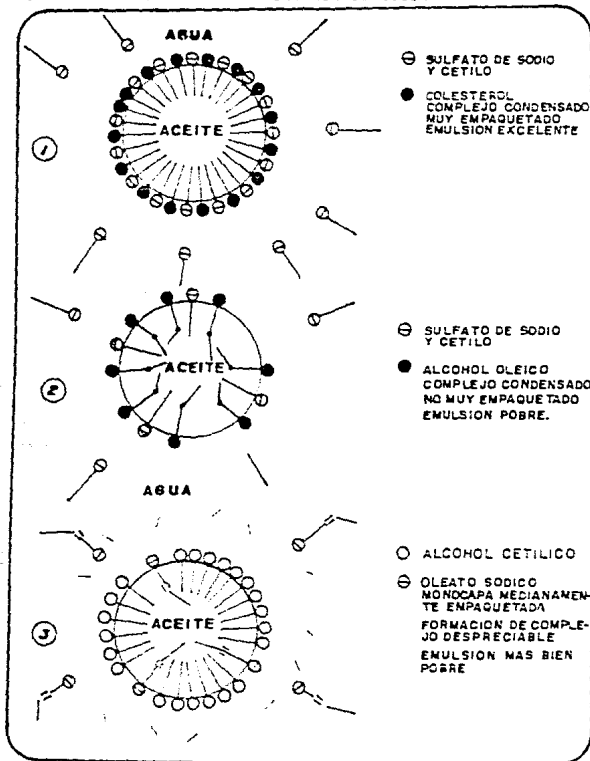
- A) - Por la solubilización del conservador dentro de micelas. La teoría fue basada en el modelo de W. Ostwald sobre el volumen de fase y fue justificada experimentalmente por Fisher y Harkins (47), ver la figura (3).

FIGURA (3): Modelo de W. Ostwald.



B).- Por la formación de complejos hidrofóbicos y débiles puentes de hidrógeno. La teoría fué propuesta por Schulman y Cockbain (48) para películas de emulsionantes mezclados. El fenómeno fué explicado determinando la resistencia a la rotura de la película interfacial influenciada por la presencia del complejo en la interfase aceite / agua.

FIGURA No (14) Modelo de Schulman Cockbain.



C) - Por la inactivación del conservador con un neutralizante. El pH tiene una considerable influencia en la actividad de los compuestos de amonio cuaternario, por regla general son más activos en medios alcalinos. La mayor parte de los agentes cuaternarios son afectados de manera adversa por sustratos orgánicos y por la dureza del agua y agentes aniónicos que neutralizan la acción bactericida. Nakashima y Miller (46) señalaron que muchos de los agentes en suspensión más comunes son de naturaleza aniónica y pueden inactivar completamente a los compuestos de amonio cuaternario.

Bandelin (43) y Aalto (49) señalaron que la actividad de los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico casi no es afectada por el pH y Bandelin señaló la utilidad que prestan los ésteres del ácido vainillínico en la zona alcalina.

5.7. Métodos para la siembra. (sc) (s2)

1.- METODOS DE DISTRIBUCION SOBRE PLACA

Una alícuota del material diluido se distribuye sobre la superficie del medio contenido en una placa, previamente secado, posibilitando que se impregne del material de modo que las bacterias queden en la superficie. Luego se invierte la placa y se lleva a la estufa. Es importante que el medio haya sido secado ya que de otro modo el líquido no impregna el agar, lo que impide la formación de colonias discretas. El mismo puede distribuirse uniformemente usando un esparcidor manual de vidrio o su equivalente mecánico, o simplemente inclinando con cuidado la placa de manera que el líquido se distribuya de manera uniforme sobre la totalidad de la superficie.

1.- METODO DE LA INCORPORACION DE LA ALICUOTA A LA DISPERSION FUNDIDA DE AGAR.

En éste caso el material diluido se incorpora directamente al medio nutritivo cuando se encuentra en estado líquido. Una alícuota de la muestra se pipetea en la caja petri limpia y esterilizada y se agrega al agar fundido a una temperatura de 45 °C. Se mezcla por rotación suave, primero en sentido de las manecillas del reloj y después al contrario (6 veces). Cuando el contenido solidifica se invierte la placa llevándola a la estufa para su incubación.

1.- METODO DE FILTRACION A TRAVES DE MEMBRANAS

Esta técnica se aplica cuando se trata de grandes volúmenes de fluido con pocos microorganismos. En éste caso el material de ensayo se filtra a través de membranas. La solución con los agentes bacteriostáticos pasan y los microorganismos son retenidos por la membrana, la que posteriormente se coloca directamente sobre la placa de agar nutritivo.

5.8 Aplicación de los métodos microbiológicos al control de productos cosméticos no esteriles. (52) (53) (54)

5.8.1 PARA EMULSIONES ACEITE/AGUA (LIQUIDOS, EMULSIONES Y GELES).

I.- MATERIALES : NO BIOXON

Agar Nutritivo	104-1
Agar Sabouraud Dextrosa	107-1
Solución al 0.3% de polisorbato 80	

II.- PROCEDIMIENTO :

1.- Se preparan las placas de Agar Nutritivo y de Agar Sabouraud Dextrosa y una solución al 0.3% de polisorbato 80 en agua desmineralizada que se distribuye en frascos para medios de cultivos en volúmenes de 100ml.

2.- Se esteriliza el diluyente y el neutralizador del conservador en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. También se preparan y esterilizan las pipetas.

3.- Las muestras se toman al azar de dos unidades de producto, al principio, durante y al final del llenado de cada lote. Si el llenado demanda más de una jornada, se toman dos nuevas muestras al iniciar el llenado cada día.

4.- De cada muestra se sacan y pesan asépticamente 5 gramos de producto, que se coloca en un tubo estéril. Se añaden 10 ml del diluyente (solución de polisorbato) y se agita enérgicamente. Como se sacaron dos muestras por ejemplo al comenzar el envasamiento, tendremos en éste caso dos diluciones. De cada una de ellas se siembra 1 ml en juegos de placas por duplicado. Estos juegos están constituidos por los siguientes medios que se incuban por el tiempo que se indica.

TABLA No (3)

TIPO DE AGAR	TEMPERATURA Y TIEMPO DE INCUBACION
A. - Agar Nutritivo	37°C dos días
B. - Agar Nutritivo	24°C cuatro días
C. - Agar Sabouraud Dextrosa	24°C dos días

5. - Transcurridos los lapsos indicados, se procede a la cuenta de las colonias en todas las placas y se establece la cuenta total promedio \bar{X} . Este promedio se multiplica por 3, y da la cuenta por gramo de producto.

$$X \text{ TOTAL} = \bar{X} \times 3$$

III CRITERIO DE ACEPTACION.

Si en todas las muestras hay menos de 500 colonias / g o ml de M.O. agrobios en los productos para niños y 1000 colonias / g o ml en los productos de uso general, y no mas de 100 colonias / g o ml de hongos y levaduras el producto se encuentra en condiciones de ser despachado y se expide el lote marcado con una leyenda adecuada que significa haber superado la prueba. Si hay más microorganismos de lo establecido, se retiene el lote una semana al cabo de la cual se repiten las pruebas en el mismo orden que la primera vez. Si el resultado es positivo, es decir las cuentas microbiológicas se encuentran dentro de norma, el lote puede ser expedido, pero si hay más de lo establecido debe rechazarse definitivamente.

Ver (5.3) y (5.5).

5.8.2 PARA EMULSIONES AGUA/ACEITE (LIQUIDOS, EMULSIONES Y GELES).

En este caso se sigue la técnica señalada en (5.8.1), pero reemplazando el polisorbato 80 al 0.3% por el mismo al 1% en monolaurato de polietilenglicol al 3%. Las disoluciones deben de ir desde 1:3 a 1:10.

5.8.3 PARA CHAMPUES Y SOLUCIONES SIMPLES (LIQUIDOS).

I. - MATERIALES

NO BIOXON

Agar Nutritivo	104-1
Agar Sabouraud Dextrosa	107-1
Unidades de filtración por membrana	

II. - PROCEDIMIENTO.

1. - Se preparan las placas de Agar Nutritivo y de Agar Sabouraud Dextrosa como se indica en 5.9.1 y se preparan y esterilizan las pipetas. Las soluciones neutralizadoras son varias y se aplican específicamente al tipo de conservador presente en el preparado. Si se trata de parabenos o compuestos fenólicos, se emplea preferentemente el polisorbato 80 al 0.3%; si el conservador es un compuesto de amonio cuaternario, se prefiere el Cirasol ALM- WF en concentración de hasta el 10%, si se trata de formaldehído, se neutraliza con dimetona 0.01-0.05%; cuando se desconoce el tipo de conservador o cuando los otros neutralizantes no han dado resultado se emplea el neutralizante universal (lecitina 0.1% y polisorbato 80 al 1%). Todos estos neutralizantes se esterilizan a 121°C durante 15 minutos.

2.- Se arman las unidades de filtración por membrana, completas tapando con algodón el brazo lateral, y envolviendo toda la unidad con hojas de aluminio antes de meterla al autoclave. También se pueden utilizar los que ya vienen esterilizados de fábrica.

3.- Se separan dos muestras al azar del producto, al principio, durante y al final del llenado del lote tomando mas muestras como se indico en las técnicas anteriores si se prolonga por más de un día.

4.- Con pipeta en forma aséptica se colocan 5ml del producto procedentes de cada una de las dos unidades que se retiran cada vez, en un frasco con 100 ml de agua esterilizada (en total ésta contendrá 10 ml de muestras). Se agita vigorosamente. Se pasa por filtro de membrana empleando vacío provisto por una trompa de agua. La membrana se lava luego con 10 ml del neutralizante apropiado sobre el mismo filtro. Con una pinza esterilizada por flameado con alcohol se pasa la membrana a la placa que contiene el agar nutritivo. Se repite la operación pero sembrando esta vez la membrana sobre agar Sabouraud Dextrosa. Se invierten las placas y se someten al mismo tiempo y temperatura de incubación ver tabla No (21).

5.- Después del tiempo señalado se cuenta el número de colonias y se hace el cálculo para 1ml de muestra.

III CRITERIO DE ACEPTACION .

Ver 5.3 y 5.5

5.8.4 PARA TALCOS Y POLVOS INSOLUBLES (POLVOS Y SOLIDOS) (72) (73).

I MATERIALES :

Caldo dextrosa con 15 mg / ml de púrpura de bromocresol.

Los diluyentes deben de elegirse deacuerdo a su poder neutralizante y facilidad de dispersión. ver anexo II.

II PROCEDIMIENTO :

1.- Se prepara el caldo dextrosa con indicador, en concentración simple y doble. Por cada muestra a examinar se requieren 10 tubos de caldo de doble concentración y 20 de concentración simple. Cada tubo debe contener 5 ml de caldo.

2.- Preparado el diluyente, se distribuyen cantidades alicuotas de 150 ml en frascos de 300 ml. Se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 minutos sin ajustar la tapa, también se esterilizan las pipetas.

3.- Se coloca asépticamente 1.5 g del polvo en exámen en un frasco de diluyente esterilizado y se prepara esta suspensión al 1%. Se siembran 10 ml de suspensión en 5 tubos de caldo de concentración doble, 1 ml en otros 5 tubos de concentración simple y finalmente 0.10 ml en otros 5 tubos de concentración simple, incubando todos a 24 °C por cuatro días. Se prepara otra serie igual de tubos, pero se incuban a 37 °C durante dos días.

4.- Después de la incubación se cuentan los tubos en los cuales el color cambió de rojo a amarillo, estos se consideran positivos. Utilizando las tablas de probabilidad (McGrady) se determina el número mas probable (NMP) de bacterias a cada temperatura. Se suman estas dos cifras para obtener el total teórico de bacterias viables por cada 100 ml de producto diluido o gramo de polvo

III.- CRITERIO DE ACEPTACION.

ver (5.3) (5.5)

5.9 INVESTIGACION DE MICROORGANISMOS PATOGENOS.

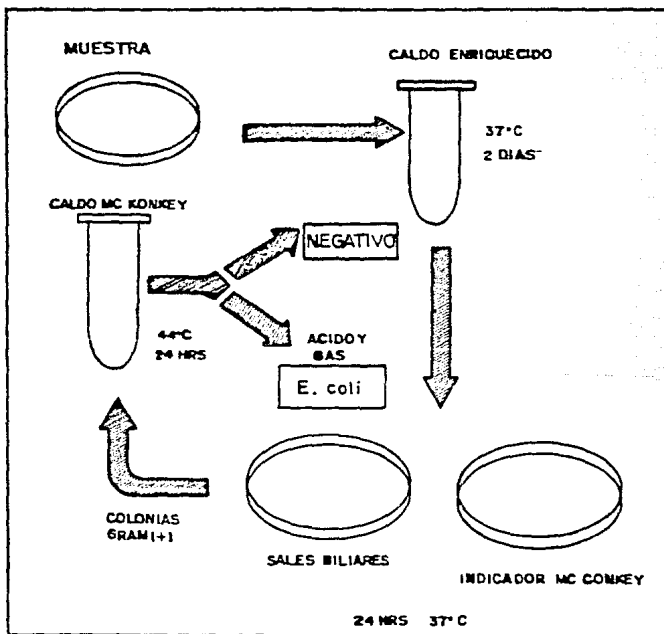
En la Ley General de Salud, se exige la ausencia de gérmenes patógenos en los preparados para la higiene, tocador y fragancias. Es aconsejable la búsqueda en forma especial de *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans*.

En estos momentos la Comunidad Económica Europea (C.E.E.), tiene en estudio métodos de prueba que serán oficializados. Pero de cualquier manera, los que señalamos a continuación son los que se usan habitualmente en muchos laboratorios. En la actualidad se comienza a experimentar con nuevos métodos de evaluación microbiológica, las cuales tienden a ser automatizadas y de rápida detección, numeración e identificación, como son los métodos conductimétricos. Pero por presentar estos algunos inconvenientes y no contar con la tecnología adecuada en todos los laboratorios es omitida en esta tesis. (20) (54) (56).

5.9.1 Identificación de Escherichia coli.

Se inocula una cantidad alícuota de la muestra del producto en un caldo enriquecido y se lleva a la estufa a 37 °C durante dos días. Con este caldo se siembran medios selectivos que contienen sales biliares e indicador (Agar McConkey) a 37 °C durante 24 horas. Colonias de gérmenes gram (+) que fermentan lactosa se siembra en un caldo equivalente (Caldo McConkey) y se incubaba a 44 °C por 24 horas. La producción de ácido y gas a esta temperatura hace suponer la presencia de E. coli. (52) (57)

DIAGRAMA (1) Identificación de Escherichia Coli.



5.9.2 Identificación de Salmonella sp. y otras Enterobacterias.

Las enterobacterias más importantes se incluyen en la familia de Enterobacteriaceae, la cual esta constituida por bacilo Gram negativos que crecen bién en los medios de cultivo. Hay especies móviles y no móviles. Todas fermentan la glucosa con producción de ácido o de ácido y gas; reducen los nitratos a nitritos y dan resultado negativo en la prueba de indofenol oxidasa. Esta familia comprende bacterias patógenas y no patógenas. Entre las patógenas se puede mencionar a Salmonella, Shigella, Arizona y algunos tipos de Escherichia. Entre las no patógenas generalmente se menciona a Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Proteus y Providencia. Sin embargo éstos últimos pueden estar asociados con casos o brotes de enfermedad pero solamente E. coli y Salmonella han sido aislados en productos cosméticos. (57) (58)

5.9.2.1 Identificación de Salmonella sp.

Se siembra la muestra en caldo enriquecido y se incuba a 37 °C durante dos días. este caldo se siembra a su vez en otro mas selectivo (con selenita o tetrastionato) a 37 °C por 24 horas. Con este caldo se inocula un medio de agar diferencial (Wilson y Blair, agar con sulfito de bismuto) y se cultiva durante 24 horas a 37 °C.

El desarrollo de colonias gram (-), de color negro o verde con brillo metálico o un depósito negro y difuso de sulfito alrededor de la colonia, hace suponer la presencia de Salmonella sp. Esto puede confirmarse cultivando en agar nutritivo a 37 °C por 24 horas y efectuando la prueba con sueros polivalentes y pruebas bioquímicas (59)

Ver diagrama (11) y Tabla (32).

DIAGRAMA No. (II)

Aislamiento e identificación de Salmonella y Shigella.

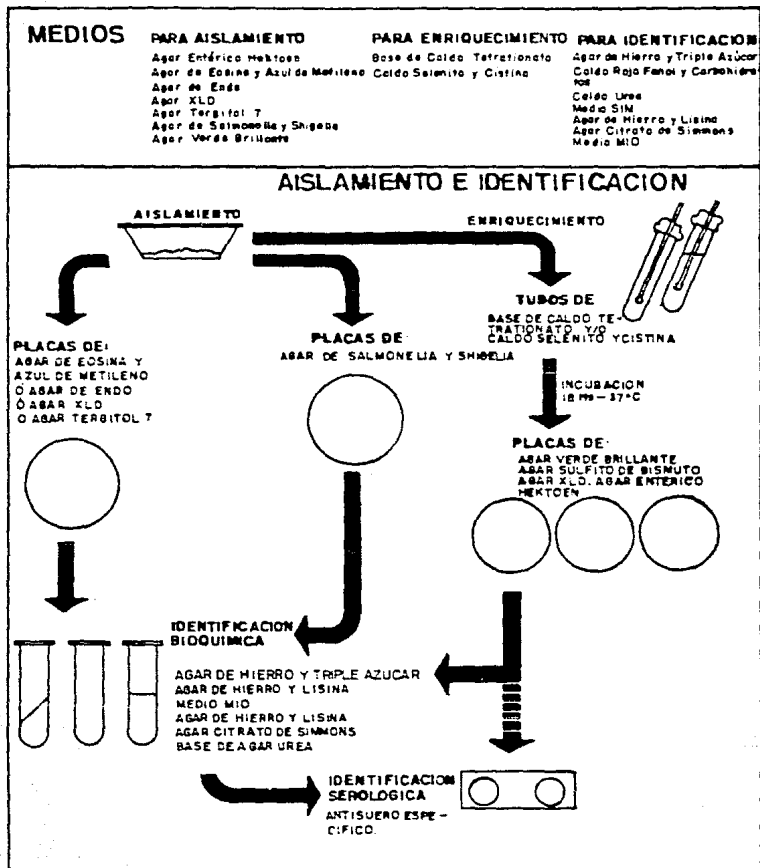


TABLA No 132 1:

Reacciones de las bacterias de la familia Enterobacteriaceae.

REACCIONES DE BACTERIAS DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE AGAR (TSI)				
BACTERIA	BISEL O DECLIVE	FONDO	GAS	H ₂ S
<i>Escherichia</i>	A (K)	A	+ (-)	-
<i>Shigella</i>	R	A	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	R	A	-	+ (-)
Otras <i>Salmonellas</i>	R	A	+	+++ (-)
<i>Arizona</i>	R (A)	A	+	+++
<i>Citrobacter</i>	R	A	+	+++ (-)

CLAVE:

A = Acido N = Neutra

K = Almidano

R = Rojo

- = Negativo

+++ = Fortísimo

5.9.3 Identificación de *Staphylococcus aureus*.

El Estafilococo aparece como un contaminante de instrumentos utilizados en clínicas y hospitales para tratamiento o curación, así mismo puede contaminar el ambiente. Además puede aparecer en los alimentos, especialmente los que se someten a procesos de elaboración industrial, tales como carnicos, lacticios etc., y a menudo son encontrados en preparados cosméticos que contienen materiales proteicos. (60) (61)

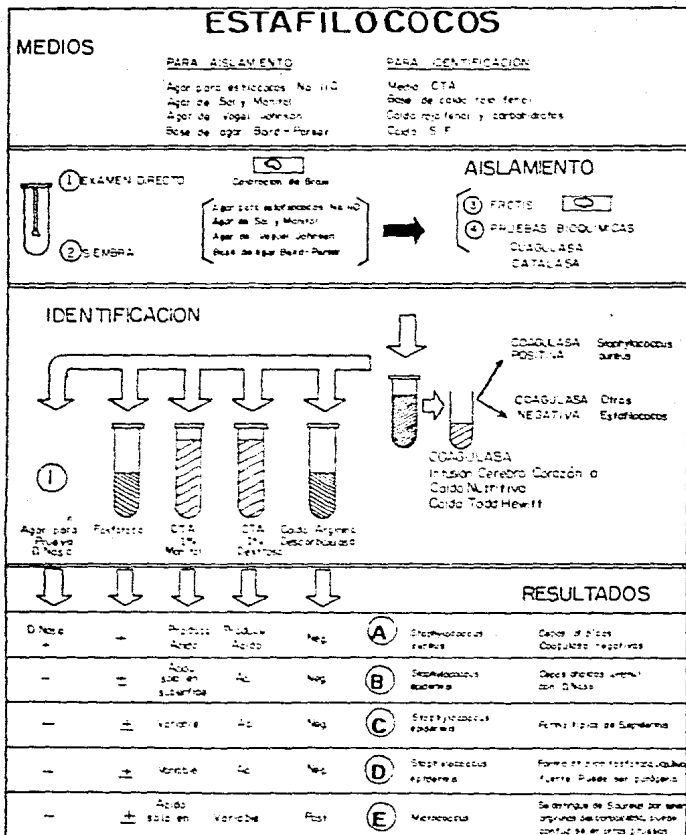
1 - Se siembra caldo enriquecido con una parte de la muestra, incubando a 37 °C por dos días. Este caldo se siembra en medio de agar diferencial (telarito-huevo o Vogel-Johnson) llevando el cultivo a la estufa por 48 hr. a 37 °C

2 - Si aparecen colonias pequeñas, de color negro, rodeadas de zonas amarillas debe pensarse que se trata de *Staphylococcus aureus*. Para confirmarlo se colocan en tubos con 0.5 ml de plasma de mamífero las colonias en exámen y se incuban a 37 °C. Se examina a las 3 y a las 74 horas. La prueba es positiva si se presenta coagulación.

3 - El Estafilococo es un microorganismo poco exigente y de rápido desarrollo. En medios no selectivos sus colonias son grandes y de consistencia butirosa y por lo general opacas, lisas circulares y enteras. A veces pueden presentar bordes ligeramente ondulados, coloración amarilla o blanca

Ver diagrama [III]

DIAGRAMA (III) Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus*



5.9.4 Identificación de *Pseudomona aeruginosa*.

Las *Pseudomonas* se encuentran sobre todo en el suelo, el agua o las plantas y como grupo son capaces de atacar a un gran número de compuestos orgánicos. A menudo se ha aislado de lesiones humanas. Las *Pseudomonas* son resistentes frente a numerosos antibióticos por lo cual se convierte en dominante tanto como comensal como en las lesiones, al ser suprimidas las bacterias más sensibles. En cosméticos tal vez sea el microorganismo más comúnmente encontrado, causando problemas en la calidad y sanidad del producto.

1. - Se siembra una alícuota de la muestra en un caldo selectivo que contiene 0.02% de ceftrixima, incubándose por un lapso de dos días a 37 °C.

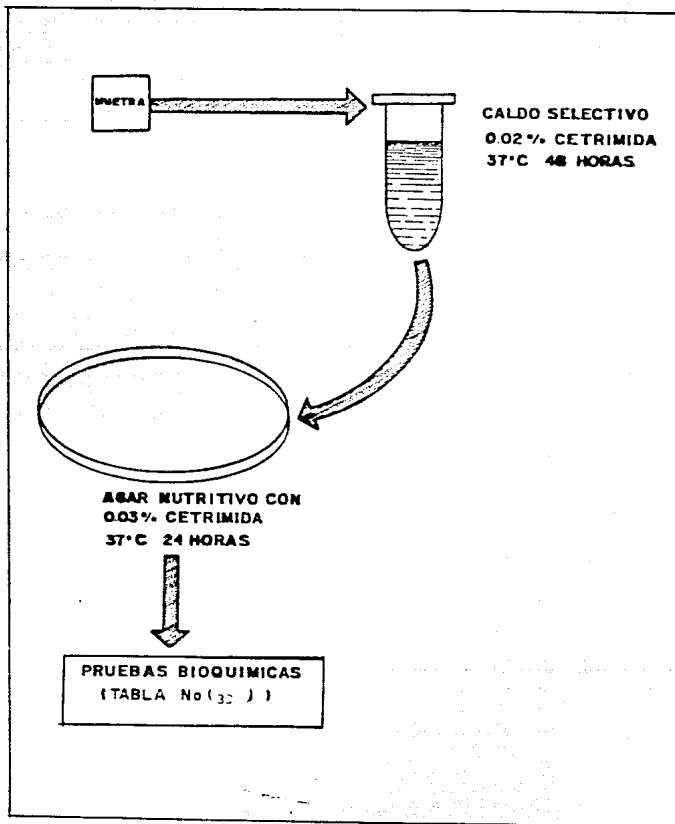
2. - Este caldo se cultiva a su vez en un medio equivalente de agar nutritivo conteniendo 0.03 % de ceftrixima y se lleva a la estufa a 37 °C por 24 horas. Toda colonia de gérmenes gram (-) que se desarrolle en esta placa con olor a trimetilamina y que muestre una pigmentación verdosa y/o fluorescencia a la luz ultravioleta, se considera que es *Ps. aeruginosa*. Por otra parte se pueden realizar pruebas bioquímicas y serológicas para su identificación. Ver tabla (III) y (IV) (40) (62) (67)

Tabla No (33) Características diferenciales de *Ps. aeruginosa*.

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE <i>Ps. aeruginosa</i>	
FLUORESCENCIA	+
MEDIO O/F	0
AGAR DE MANNITOL	-
MOTILIDAD	-
OXIDASA	+
DESARROLLO A 42 °C	-
DESARROLLO A 4 °C	-
OXIDACION DE GLUCONATO	+
GLUCOSA O/F	+
GELATINASA	+
AMILASA DISMILASAS	+

DIAGRAMA No IV

Aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*.



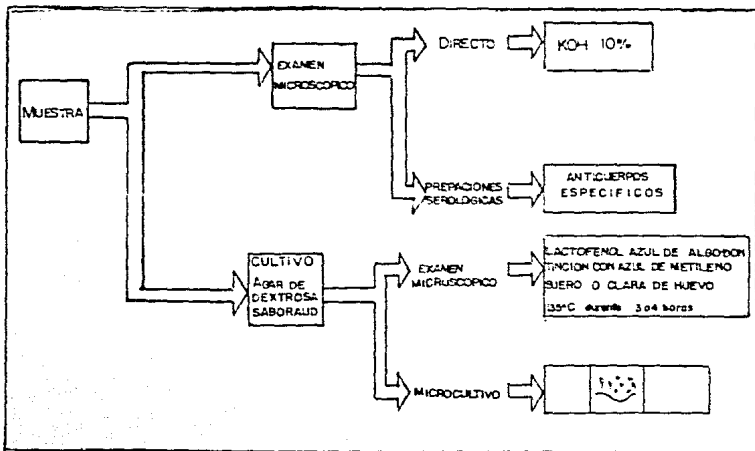
5.9.5 Identificación de *Cándida albicans*.

Cándida albicans y otras especies de *Cándida* se encuentran presentes con frecuencia en las mucosas normales de la boca, vagina y tubo digestivo. Cuando se hacen invasivas pueden producir diferentes tipos de lesiones, agudas o crónicas, o más o menos deseminadas. Los cosméticos pueden ser contaminados por *Cándida albicans* y presentar un serio problema de contagio, por lo cual deberán estar libres de éste microorganismo.

En los cultivos sólidos para hongos sobre todo aquellos que provocan micosis profundas, se recomienda no emplear cajas petri, por el gran peligro que presentan las dispersiones de esporas que son altamente infectantes. En su lugar reemplazarlas por tubos de ensayo grandes de 25 X 1500 mm. sin tapa de rosca, tapados con algodón (63) (64) (65) (66)

Para su identificación seguir el siguiente diagrama:

DIAGRAMA (V) Identificación de *Cándida albicans*.



RESUMEN

La Secretaría de Salud ve la necesidad de que México cuente con sus propias normas y técnicas para el control microbiológico. Por lo cual se han propuesto varios trabajos de investigación como es el caso de esta tesis.

En ésta tesis se recopilaron los métodos más importantes que se encuentran para el control microbiológico de los cosméticos y se desarrolló un proyecto tentativo de norma oficial.

Un cosmético es una substancia de uso externo, destinado a incrementar preservar o restituir la belleza del cuerpo humano. En la actualidad se reconocen seis formas cosméticas fundamentales; polvos, líquidos, emulsiones, géles, sólidos y aerosoles. Los cosméticos contienen conservadores que son agentes que prolongan el almacenaje y vida media del cosmético. Los microorganismos encontrados en cosméticos son: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Actrytis*, *Alternaria*, *Closporium*, *Cándida* y bacterias como; *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*, *Aerobacter aerógenes*, *Pseudomona*, *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus* y *Clostridium*. El desarrollo de los microorganismos es afectado por la actividad del conservador el cual depende del pH, coeficiente de partición y de la actividad biológica del conservador.

Para el estudio sobre el control microbiológico, ésta tesis se basó en un estudio experimental realizado por la CTFA (Asociación de Cosméticos Productos para el Tocado y Fragancias). Los miembros de la CTFA representan el 90% del total del volumen de ventas a nivel mundial. La evaluación se realizó con 3,907 productos cosméticos recolectados de tiendas en los Estados Unidos. Para su estudio 21 laboratorios miembros de la CTFA participaron.

La evaluación comenzó con una prueba piloto, para poder eliminar potenciales problemas durante el desarrollo. Para lo cual se recopilaron todas las técnicas de evaluación microbiológica de las empresas líderes; Avón, Ciba-Geigy, Clearol, Max Factor, Revlon, Lever Bros. La variación en la metodología entre cada laboratorio consistió en el uso o no de medios enriquecidos, en la cantidad y tipo de neutralizante.

Para la prueba piloto se muestrearon 90 productos cosméticos. Los resultados indican la ausencia de *S. aureus*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*. El 99% de los productos cosméticos cumplieron con las normas establecidas por la CTFA, el 84% de los productos se encontraron libres de microorganismos y un 1% de los productos muestreados contenía más de 1000 colonias / gramo de producto.

Para la prueba global se realizó el mismo estudio pero con 3,907 productos cosméticos, los cuales se dividieron en 11 categorías: productos para bebé, cosméticos para los ojos, fragancias, preparaciones para el cabello, maquillajes, preparaciones para las uñas, productos para la higiene oral, productos para la limpieza personal, preparaciones para afeitarse, productos para el cuidado de la piel y especialidades cosméticas.

En el estudio se encontró que por formulación los polvos presentaron, el mayor porcentaje 10% con muestras de más de 20 colonias / g de muestra siguiendo la emulsiones con 1.6%, líquidos con 1.7%, géles con 1.7% y los aerosoles con 0%. Por categoría los productos que tuvieron un mayor porcentaje de muestras positivas fueron: los productos para la higiene oral con 7.6%, preparaciones para afeitarse con 5.8%, fragancias con 4.7%, productos para bebé con 3.7%, maquillajes 3%, productos que se aplican en el área de los ojos 2.5%. Los demás productos tuvieron menos del 2%. Las muestras se encontraron libres de *S. aureus*, *E. coli*, pero no de *Ps. aeruginosa* que fué encontrada en géles y líquidos.

El 95.5% de los cosméticos muestreados quedó dentro de la norma de la CIPA y el 100% de los productos para bebé, y los que se aplican en el área de los ojos quedaron dentro de norma, menos de 500 colonias / gramo de producto.

De acuerdo a los lineamientos de la Dirección Nacional de Normas y a la Ley General de Salud para el Proyecto Tentativo de Norma para el Control Microbiológico de Cosméticos en México, las muestras deben recolectarse directamente de los lotes de fabricación o de muestras recolectadas del mercado, conteniendo: categoría del producto, fecha y lugar de compra, nombre del producto, nombre de la compañía que lo fabrica, número del registro de Salubridad, contenido en unidades del sistema métrico decimal, identificación del lote de fabricación y formulación siempre y cuando lo indique la Secretaría de Salud.

Para decidir sobre la aceptación de un lote de transacción comercial se toman al azar 12 muestras de producto por cada lote de fabricación los que se dividen en 3 grupos de 4 unidades. Un grupo se destina al fabricante otro para el comprador y el restante se guarda como terciaría. El criterio de aceptación tiene el siguiente lineamiento: si al probar las unidades de producto uno de los grupos o más no cumple con las especificaciones de la Secretaría de Salud, el proveedor o el fabricante pueden exigir que se pruebe el grupo de la terciaría el cual decide en forma definitiva la aceptación o rechazo de un lote.

La aplicación de los métodos para el control microbiológico son los que aplica la CTFA, pero se hace incapie en el uso adecuado de los neutralizantes. Para el análisis de los cosméticos estos se clasificaron de acuerdo a su forma fisicoquímica; emulsiones aceite/agua, emulsiones agua/aceite soluciones simples y polvos insolubles. Existiendo un procedimiento específico para cada una de ellas.

Para emulsiones aceite/agua se utilizó como agente neutralizante polisorbato 80 al 0.3% y se sembraron las muestras en agar nutritivo y agar sabouraud dextrosa, transcurrido el tiempo de incubación se contaron las colonias y se reportó colonias/gramo de producto.

Para emulsiones agua/aceite se siguió la misma técnica pero se cambió el neutralizante polisorbato 80 al 0.3% por el mismo al 1.0% en monolaurato de polietilenglicol al 3%.

Para champúes y soluciones simples se utilizó como neutralizante lecitina al 0.1% y polisorbato 80 al 1%. Para realizar éste análisis se separaron las muestras las cuales correspondieron al principio, durante y final del llenado del lote. Las muestras se diluyeron y pasaron a través de unidades de filtración de membrana. La membrana se lavó con la solución neutralizante y se colocó en placas de agar nutritivo y de agar sabouraud dextrosa. Se incubaron las muestras y después del tiempo señalado se calculó el número de colonias/gramo o ml de producto.

Talcos y polvos insolubles fueron diluidos en un diluyente adecuado a la neutralización del conservador y dispersión de los polvos. Las muestras se sembraron en tubos con caldo dextrosa y 15 mg/ml de púrpura de bromocresol. Se incubaron y después se leen en los que existió un cambio de color. Para la cuantificación se utilizó el método N.M.P. (Número más probable) y se reportó en M.D. viables/ gramo de muestra.

Para el aislamiento de los microorganismos patógenos se utilizaron medios selectivos:

Para el aislamiento de *E. coli*, las muestras se incubaron en caldo nutritivo y posteriormente se sembraron en placas de sales biliares o agar MacConkey. Las colonias gram positivas se siembran caldo MacConkey al aparecer ácido y gas nos indicó la presencia de *E. coli*.

Para el aislamiento de *Salmonella* sp. las muestras se sembraron en tubos con base de caldo tetrationato y o caldo selenito y cisteína. Posteriormente se incubó en placas de agar verde brillante y se realizaron pruebas bioquímicas y serológicas.

Para aislar *S aureus* las muestras se sembraron en placas de agar sales manitol o medio 110. Las placas se incubaron y posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas, los resultados nos indicaron la presencia o ausencia de la especie.

Para el aislamiento de *Pseudomona aeruginosa*, las muestras se sembraron en caldo selectivo 0.02% de ceftrimida y se incubaron. Posteriormente se sembraron en placas de agar nutritivo con 0.03% de ceftrimida y se realizaron pruebas bioquímicas.

Para el aislamiento de *Cándida albicans*, las muestras se sembraron en agar sabouraud dextrosa. Después de la incubación se realizaron exámenes microscópicos y preparaciones serológicas.

Estas técnicas son las que aplican los países de la Comunidad Económica Europea y los laboratorios miembros de la CIFA, las cuales están basadas en la metodología de la USP XXI.

Esta tesis necesita su posterior validación para que sea oficializada como norma dentro de la Ley de Salud y cumpla con los lineamientos que la ley fija.

VII CONCLUSIONES.

- 1).- Se recopilaron las técnicas de control microbiológico de cosméticos de las empresas líderes: Avón, Ciba-Geigy, Max Factor, Revlon, Lever Bros y Bristol-Myers.

La mayor parte de las técnicas de control microbiológico empleadas por la CTFA están basadas en la USP XXI

- 2).- Las diferencias encontradas entre las técnicas usadas por los laboratorios consiste en el uso o no de medios enriquecidos y en el tipo y cantidad de neutralizante.

- 3).- Las técnicas propuestas en ésta tesis son las que aplican los países de la Comunidad Económica Europea y los laboratorios miembros de la CTFA, pero se hace hincapié sobre el uso correcto de los neutralizantes y de la aplicación práctica de las técnicas de análisis dependiendo de la categoría y forma tecnológica del preparado.

VIII ANEXOS.

8.1. Anexo I. Definiciones (36).

8.1.1 Unidad de producto:

Es cada lote individual de los constituyen el lote motivo de la inspección.

8.1.2 Lote de fabricación:

Es la cantidad de producto elaborado bajo las mismas condiciones de fabricación y que responden esencialmente a las mismas especificaciones

8.1.3 Lote de entrega:

Número total de unidades de producto, que constituyen el lote motivo de la transacción comercial y que puede estar compuesto de varios lotes de fabricación.

8.1.4 Especimen:

Es el conjunto de cada una de las porciones de material suficiente para efectuar las pruebas que la norma establece, que se extraen de las unidades de producto sobre las cuales se va a efectuar las determinaciones siguiendo los métodos de prueba que indica la norma.

8. ANEXO II. Lista de Conservadoras y Neutralizantes.

Tabla No (14)

Preservativos	Neutralizantes/Inactivaciones	Referencias
Alcohols (ethanol, isopropanol, benzyl, phenylethyl, phenoxethyl, propylene glycol)	Nonionic surfactants Nonionic surfactants especially polysorbate 80 Acacia, albumin Dilution Serum, horse blood	Anon. 1985 Wallmauser 1984 * Russell et al. 1979 Wallmauser 1984
Benzoates (2-bromo-2-nitro-propene-1,3-diol)	Sulphydryl compounds: cysteine, thioglycolate, thiosulfate and metabisulfite	Holland 1984
Chlorhexidine (chlorhexidine gluconate, chlorhexide me diacetate)	Neutral to alkaline pH 3% tecthin/10% polysorbate 80	ICI Americas, Inc.
Formaldehyde	Magnesium trisulfate, magnesium aluminum silicate, L-lysine, high pH	Russell 1982
Glutaraldehyde	Anionic surfactants 0.5% polysorbate 80	Anon. 1985 Broun & Richards 1964
Hexamethylenetetramine (hexamine, hexamethylenetetramine HCL)	Neutral to alkaline pH Polysorbate 80/tecthin	Wallmauser 1984 Hockinon 1974
Hydroxyacetic acid (3-acetyl-4-methyl-2H-pyran-2,4(3H)-dione)	Neutral to alkaline pH Some metals	Wallmauser 1984 Anon. 1985
Formaldehyde	Dilution/filtration	Dow Chemical Co.
Formaldehyde	Protein, gelatin	Anon. 1985
Formaldehyde	Sodium sulfite, arsenite	Russell et al. 1979
Formaldehyde	Histamine	Wash & Hirsch 1954
Formaldehyde	D/E medium	Engley & Day 1970
Formaldehyde	Hg ²⁺ or Ca ²⁺ ions, artificial hard water	Dankert & Schut 1974 Russell & Furr 1977
Formaldehyde	Dilution/filtration	Sutton Lab., Inc.
Formaldehyde	Dilution/filtration	Sutton Lab., Inc.
Formaldehyde	Ampholyte primary amines at neutral to basic pH	Anon. 1985
Formaldehyde	Sodium bisulfite	Day & Engley 1970
Formaldehyde	Sodium sulfite, glycine, dilution/filtration	Russell 1982
Formaldehyde	Cysteine or cysteine at pH 8, sodium bisulfite, sodium thiosulfate, glycine, dilution/filtration	Gorman & Scott 1974
Formaldehyde	D/E medium	Engley & Day 1970
Formaldehyde	Formaldehyde	

Table Continued

<u>Preservatives</u>	<u>Neutralizers/Conditioners</u>	<u>References</u>
<u>Bathes (6)</u> (methylisothiazolinone and methylchlorisothiazolinone)	Amines, sulfites, mercaptans Sodium bisulfite, sodium thiosulfate	Anon. 1985 Bohn & Neas, Inc. Favet et al. 1985
<u>Mercurials</u>	Heparin Sulfhydryl compounds Thioglycolic acid B/E medium Sodium thiosulfate, sodium bisulfite	Russell 1982 Crosshaw 1983 Engley & Dey 1970 Coe et al. 1973
<u>Organic Acids</u> (benzoic, propionic, sorbic)	Neutral to alkaline pH Nonionic surfactants, CaCl ₂ Dilution	Russell 1982 Anon. 1985 Russell et al. 1979
<u>Craben 8</u> (dimethyl azoxalacetate)	Polysorbate surfactants pH less than 5.5 - 6	Spittenbender 1973 Anon. 1985
<u>Paraben</u> (methyl-, ethyl-, propyl- and butyl-para-hydroxy-benzoate esters)	Lectin, filtration Nonionic and cationic surfactants Lectin/polysorbate	Russell et al. 1979 Anon. 1985 Abshire & Schelech
1982	Nonionic surfactants, vegetable gums, polyethylene glycol, Nonionic ethers and esters 1% polysorbate 80 or 20 Dilution	Anon. 1985 Brown 1966 Russell 1982
<u>Phenolic and Chlorophenolic compounds</u> (phenylphenol, chloroxylenol, cresols, chlorocresols, phenol)	Polyvinylpyrrolidone, Trapaecanth gum, 1% polysorbate 80, alkaline pH Dilution, polysorbate 80, nonionic surfactants Nonionic surfactants, carbosymethylcellulose, polyethylene glycol, protein Lectin, filtration	Griff, 1983 Russell et al. 1979
<u>Pyrimidines</u> (thiourea and zinc pyrithione)	B/E medium 2% polysorbate 80 EDTA, chelating agents, anionic surfactants	Dey & Engley 1983 Bergen & Lysted 1971 Anon. 1985
<u>Quaternary ammonium compounds</u> (Cetrimide, benzethonium chloride, benzalkonium chloride)	High pH (8) 0.5% polysorbate 80 Lectin/Polysorbate Anionic detergents, hard water Organic material Nonionics, protein B/E medium	Fenn & Ezejo 1982 Brown & Richards 1964 Russell 1982 Anon. 1985 Crosshaw 1983 Wallhauser 1985 Engley & Dey 1970, 1983
<u>Indolicaine, etc.</u>	Neutral to alkaline pH	Wallhauser 1984

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Helman, José., "Farmacotecnia Teoría y Práctica" vol V., Continental 41: (1485-1496) 1984.
- 2.- Muscatiello, Mj., "Evaluation of Impedance Microbiology", Cosmetics & Toiletries, 102, (43) 1987.
- 3.- Mulberry, Gayle., "Rapid Screening Methods for Preservative Efficacy Evaluations", Cosmetics & Toiletries, 102, (47) 1987.
- 4.- Ashour, M., "Microbial Contamination of Cosmetics and Personal Care Items in Egypt", Cosmetics & Toiletries, 102, (61-63) 1987.
- 5.- Singer, Sol., "The use of preservative Neutralizers in Diluents and Plating Media", Cosmetics & Toiletries, 102, (55-59) 1987.
- 6.- "United States Pharmacopeia XIX", Merck Publishing Co., 61: (1151-1155) 1979.
- 7.- "British Pharmacopeia", London, Her Majesty's Stationery Office, Vol I, (185-186, 192-194) 1980.
- 8.- S.S., "Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos", 4a. Ed., (590, 971, 972) 1974.
- 9.- Tenenbaum, Saul., "Methodology for the National Microbiological Survey of Cosmetics and Toiletries", CTPA Cosmetics Journal, 2, 3: (19-29) 1977.
- 10.- S.S., "Ley General de Salud", 3er Edición Porrúa., (405-424) 1987.
- 11.- Meneses, Luisa., "Importancia de los Esteres del Acido p-Hidroxibenzoico En las Industrias Farmacéuticas y Cosméticas", (1-26) 1986.

- 12.- Diario Oficial, 7da Sección. (8-73) lunes 19 de enero de 1985.
- 13.- Harry, Rg., "The Principles and Practice of Modern Cosmetics" . Leonard Hills ,Londres. (Introducción) 1962.
- 14.- Helman. José , "Farmacotécnia Teoría y Práctica", Vol VII, 65: (7265-2320) 1981.
- 15.- Martín, Alfred. "Principios de Fisicoquímica Para Farmacia y Biología" . Edit. Alhambra España . (140-169,579-634) 1984.
- 16.- Carstensen. Jeanturo. "Solid Pharmaceutics Mechanical Properties and Rate Phenomena" . Academic Press. (43-57,218,219) 1980.
- 17.- Fuertes. Julian , "Emulsiones Teoría y Práctica", Edit Blum Madrid (1-3,83-127) 1972.
- 18.- Balsam. Ms . and Barnett, G . " Cosmetic Science and Technology" . 2da Edición. . Interscience Publishers. . (1034-1052) 1972.
- 19.- Wilson, La . and Reynolds, A . " Contamination in Ocular Cosmet. " , Amer J. Ophthamol . , 67: (52) 1969.
- 20.- Jarvis, B. "Survey of Microbiological in Cosmetics and Toiletries in the U.K." , J. Soc Cosmet. Chem. 25: (563-575) 1974.
- 21.- Decker, Raymond. "Frequency of Preservatives Use 81 in Cosmetic Formulas as Disclosed to FDA-1987" , 102, (21-23) 1987.
- 22.- Dunnigan, A. p. and Evand, J. R. , "Report a Special Survey Microbiological Contamination of Topical Drugs and Cosmetics" , T.C.A. Cosmetics Journal 2: (18) 1970.
- 23.- Wolven, A. and Levenstein, I. . "Cosmetics Contaminated Or Not" . T.C. Cosmetics Journal .1: (34) 1969.

74. - Fraenkel, Vinopal. "Carbohydrate Metabolism in Bacteria". *Annu rev Microbiol.* 25, (127) 1971.
75. - Kelly, Dp. "Autotrophy Concepts of Litotrophycs Bacteria and Their Organ c Metabolism". *Annu Rev. Microbiol.* 27, (69) 1971.
76. - Food and Drugs Administration. "Pruebas y Métodos de Ensayo de Antibióticos y Conservadores". Vol 105, 105: 1750-7531.
77. - Abshire, R.L. and Schelech, B A. "Methods for Evaluation the e---ffectiveness of Preservative Systems in Watermiscibles Aintens". *Sci. Techol.* 36: (216-221) 1997.
78. - Beveridge, E C. "Microbial Spoilage and Preservation of Pharmacytical Products". 7da Ed. Blackwell Press. (226-229) 1993
79. - Ferguson, J., *Proc. Roy. Soc. Med.* 8: (127-127) 1939.
30. - Allawala, N.A. and Riegelman, S. *Pharm. Assoc. Sci.* (43,93) 1954
31. - Bean, H.S. *J. Soc. Cosmetic. Chemist.*, (43,93) 1973.
32. - Rieger, Martin. "El Aparente pH de la Piel". *Cosmetics & Toiletries*, 104, (53) march 1989.
33. - Tenenbaum, Saul. "Methodology for the National Microbiological Survey of Cosmetics and Toiletries, 1972-1975". *CTFA Cosmetic Jornal* vol, 3, 3: (22-28) 1977.
34. - A.O.A.C. "Methods of Analysis of the Association of official Analytical Chemist". (114,354) 1970.
35. - USP XXI Microbiological Test, *Microbiological Limit Test.* (151-156)
36. - NCM-R-50. "Guía para la redacción estructuración de las normas oficiales Mexicanas.

37. - Microbiological Content Subomite. Microbiological Limit Guideline for Cosmetics and Toiletries. CTFA Cosmetics Journal, 4, 3: (25-32) 1972.
38. - Microbiological Limited Guidelines for Cosmetics and Toiletries and Fragrance Association 1973.
39. - Kalling, L. O. and Silvertolpe, L. "Microbiological Contamination of Medical Preparations". Acta Pharm. Suecia. 3, (219) 1979.
40. - Simmons, J. "Standar Methods for Examination of Water". Ed. Apha Inc. 19: (209, 1926) 1978.
41. - Singer, Sol. "The Use of Preservative Neutralizer in Diluent and Plating Media". Cosmetics & Toiletries, 102, (55-58) 1987.
42. - Bergam, T. "Disinfectant Evaluation by Capacity use Dilution Test" J. App. Bacteriol. 34: (185-195) 1971.
43. - Brown, Mrv. "Turbidometric Method for the Rapid Evaluation of anti microbial Agent". Journal Soc. Cosmetic Chem. 17: (120-215) 1976.
44. - Brown, Mrv. "Effect of Polysorbate (tween 80) on the Resistance of Pseudomonas aeruginosa to Chemical Inactivation". J. Pharm. 165: (51-55) 1974.
45. - Feeley, Jr. "Sterility Testing Detection of Fungi and Yeast in the Presence of Preservatives". Journal Biol. Stand. 1: (11-19) 1973.
46. - Croshaw, B and Holland, Vr. "Use of Bronopol as a Cosmetic Preservative in Cosmetics and Drug Preservation". Edit. Kovana New York Marcel Dekker Inc.. (31-62) 1984.
47. - Dankert, J. "The Antibacterial Activity of Chloroxyleneol in Con-- with Ethylenediaminetetracetic". J. Hyg, 76: (11-22) 1976.

48. - Bandelin, J., Journal Am. Pharm. Assoc. Sci., (117-131) 1964
49. - Firman, Mc. and Rigler, Ne., Journal Pharm Assoc. Sci., (42-44) 63
50. - Wolven, A., 'Microbiological Examination of Cosmetics', Am. Cosmet and Perfumery., 27: (63-65) 1972
51. - Cowan, St. and J. Steel., 'Manual Para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica', Edit. Panamericana., (269,135-140) 1974.
52. - Helman, José., 'Farmacotécnica Teoría y Práctica, Métodos Para el Ensayo de los Productos no Esteriles', Vol. V. Edit. Continental (1503-1509) 1974.
53. - Tenenbaum, S., 'Determination of the Microbiological Content of Water miscible Cosmetic Lotions: Preliminary Report of the Collaborative Study', T.C.A. Cosmetic. J., 2: (24-29) 1970.
54. - S.S., 'Ley General de Salud', 3er. Edición Porrúa., (516-529) 1987.
55. - Code of Federal Regulation., 'Voluntary Filling of Cosmetics Product Ingredient and Cosmetic Ray Material Composition Statement', Part. 790., 1987.
56. - Food & Drugs Administration., 'Bacteriological Analytical Manual', 1976.
57. - Edward, Fitz., 'Applied Microbiological Identification of Enterobacteriaceae', Burgess Publishing Co. Minneapolis Minn., 9. (478) 1982.
58. - Morse, L., et al., 'Septicemia due to Klebsiell. pneumoniae and originating from Hand Cream Dispenser', New England Journal of Medicine., (277-281) 1977.

59. - Mac Faddin, Jean F., "Pruebas bioquímicas Para la Identificación de bacterias de Importancia Clínica". Edit. Panamericana, (269, 273-274) 1984.
60. - Dey, Pp. and Engley, Fb., "Methodology for Recovery of Chemically Treated Staphylococcus aureus with Neutralizing Medium". Appl. Environ Microbial 45: (1553-1537) 1993.
61. - Davis, Ved and Dulbecco, R., "Tratado de Microbiología". Eer. Ed. Salvat., 4: (38-42) 1995.
62. - Noble, Wc. and Savin Ja., "Steroid Cream Contaminated and pseudo--domona eruginosa". Lancet, 1: (347) 1977.
63. - Sabouraud, Am. and Syphilon, Georg., J. Lab. Clin. Med. 67: (355) 1953.
64. - Vogel, Ra., "Method for de Rapid Identification of Candida albican in Clinical Materials". Am. J. Clin. Path., 28: (103) 1975.
65. - Wilson, La. et all., "Fungi from Normal Auter Eye", Amer. J. Opht 67: (52) 1975.
66. - Levine, J., "Inf. Dis.", J. Bact., 22: (43) 1964.
67. - Tenenbaum, S., "Pseudomonads in Cosmetics", Journal. Soc. Cosmt. Chem., 12: (797) 1979.
68. - Steinberg, D.C., "Cosmetics Preservatives", Drugs Cosmetics, 134, 5: (32-35) 1984.
69. - Richardson, El., "Preservative Frequency of Use in Cosmetics Formulas as Disclosed to FDA", Cosmet. & Toiletries, 96, 3: (91-93) 1977.

70. - Richardson, E.I. 'Frequency of preservative use in Cosmetic Formula Disclosed to FDA'. *Cosmetics & Toiletries*, 96, 3: (85-87) 1981.
71. - Decker, R.L. 'Frequency of Preservative Use in Cosmetic Formulas Disclosed to FDA -1982 up Date'. *Cosmetics & Toiletries*, 97, 11: (57-59) 1982.
72. - Garret, E.R. *J. Pharm. Pharmacol.* 18: (589) 1966.
73. - Mc. Grady, M.H. *Canadian Publ. Health*, 9: (201) 1918.
74. - Navarre, Nr. 'The Chemistry and Manufacture of Cosmetics'. Tomo Londres, 1969.
75. - Evan, W.P. *J. Pharmacol.* 17: (217) 1970.
76. - Anon. 'Cosmetic Preservation Encyclopedia'. *Cosmt. & Tol.* 100 (85-101) 1985.
77. - Gavins, Jones. 'The Cosmetics Industry in Chile'. *Comet. & Toilt.* 101, (20 -32) 1988.
78. - Gavin, Jones. 'Legislative Trend en E.U.'. *Cosmetics & Toiletric* 102, (35-44) 1988.
79. - Hall, Nicolas. 'European Trends'. *Cosmetics & Toiletries*, 103, (45-90) 1988.
80. - Mateos, Agustín. 'Compendio de Etimologías Grecolatinas del Español'. 19 ed. Editorial Esfinge, [193-194] 1981.
81. - Reader's, Digest. 'Gran Diccionario Enciclopédico Ilustrado'. Tomo III, (506) 1981.
82. - Rodriguez, Cuervo. 'Eficacia de los Cosméticos'. *Perfumeria Moderna*, 196, (12-32) 1955.