



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**ESTUDIO DE CALIDAD MICROBIANA DE
DOS CREMAS PARA EL TRATAMIENTO EN
PROBLEMAS DE LA PIEL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:
CLAUDIA ELIBET MARTINEZ BARBOSA**

**ASESORES:
DR. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO
M. en C. NATHALIEL SOTO GUEVARA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Dedicado especialmente a mis Papás, a mis hermanas y hermano cuyo entusiasmo por este trabajo me animó a cumplir un sueño, sabiendo que mi sueño es una oportunidad, es mi destino, es mi vida.

Dedicado también a mis amigas: Moní, Eri, Gibe, Chío, Lore, Bety´s, Genarito y a mi asesora Dr. Susí.

A todos ellos les dedico la presente como agradecimiento por el apoyo brindado durante estos años de estudio y como un reconocimiento de gratitud al haber finalizado esta carrera.

Papás, sabiendo que no existirá una forma de agradecer una vida de sacrificio y esfuerzo, quiero que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes y que la fuerza que me guió a conseguirlo fue su apoyo.

GRACIAS!!

INDICE

Índice de Abreviaturas.....	I
Índice de Figuras.....	II
Índice de Tablas.....	III
RESUMEN.....	IV
1. 0. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Ozono terapéutico.....	3
1.2. Toxicidad del ozono.....	4
1.3. El ozono como bactericida, fungicida y virucida.....	6
1.4. Ozonoterapia.....	7
1.5. Aplicación de Derivados de Aceites Naturales con Ozono.....	11
1.6. Incremento del suministro del oxígeno a los tejidos.....	13
1.7. Estimulación de las defensas Enzimáticas.....	15
1.8. Productos analizados.....	16
1.8.1. Flebozon.....	17
1.8.2. Dermozon.....	17
1.9. Antisépticos.....	18
1.9.1. Recomendaciones para el uso de un antisépticos.....	18
1.10. Algunas Infecciones de la piel y de los tejidos blandos.....	19
1.10.1. Las manchas en la piel.....	20
1.10.2. Acné vulgar; acné quístico; granos.....	20
1.10.3. Escáras decúbito; ulcera de presión.....	21
1.10.4. Ulceras varicosa.....	21
1.10.5. Ulcera arteriales.....	22
1.10.6. Tratamiento local de las úlceras.....	23
1.11. Principales Microorganismos Patógenos en función a la vía de administración del producto (producto dérmico).....	24
1.11.1. Infección por estafilococos.....	24
1.11.2. Infección por <i>Pseudomonas</i>	27
1.12. Prueba de Limites Microbianos en Productos Farmacéuticos.....	28
1.13. JUSTIFICACIÓN.....	31
1.14. HIPÓTESIS.....	31
2.0. OBJETIVO GENERAL.....	32
2.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	32

3.0. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	33
3.1. MATERIAL.....	33
3.2. METODOLOGÍA.....	33
3.2.1. Preparación de muestra.....	33
3.2.2. Cuenta total de Mesófilos aerobios y hongos filamentosos y levaduras.....	34
3.2.3. Investigación de Microorganismos Objetables: <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i>	34
3.2.4. Evaluación del sistema de preservación.....	37
3.2.5. Diagrama de flujo: Evaluación de cremas (Límite microbiano).....	38
3.2.6. Diagrama de flujo: Evaluación del sistema de preservación.....	39
4.0. RESULTADOS.....	40
5.0. DISCUSIÓN.....	44
6.0. CONCLUSIÓN.....	47
7.0. REFERENCIAS.....	48

I. Índice de Abreviaturas

FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
MGA	Método general de análisis
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UFA	Ácidos grasos Saturados
GSH	Glutation reducido
GSSH	Glutation oxidado
NADPH	Adenin nicotinamida dinucleotido fosfato reducido
NADP	Adenin nicotinamida dinucleotido fosfato oxidado
ATP	Adenosin trifosfato
DPG	2,3, difosfoglicerato
ADP	Adenosin difosfato
DNA	Acido dexosirribonucleico
LD 50	Dosis letal 50
UA	Ácido urico
PO ₂	Fosfato
LPO	Lipoperoxidos sanguineos
GPx	Glutation peroxidasa
GRd	Glutation reductasa
ECN	Estafilococos coagulasa negativo
TSST	Toxina del síndrome del shock tóxico
rRNA	Acido Ribonucleico ribosomal
CLM	Caldo Lethen Modificado
CST	Caldo Soya Trypticaseína
CT	Caldo Tioglicolato
BHI	Infusión Cerebro Corazón
AST	Agar Soya Trypticaseína
PDA	Agar Dextrosa y Papa
NMP	Número Más Probable
ATCC	Colección de cultivos tipo americanos (American Type Culture Collection)
O ₃	Ozono
H	Hidrógeno
M	Molaridad (moles/Litro)
Min	minutos
MG	miligramos
PPM	partes por millón
G	gramos
µg	microgramo
m ³	metro cúbico
°C	grados centígrados o grados celsius

II. Índice de Figuras.

Figura 1.	Mecanismo del incremento de la disponibilidad de energía para las células	10
Figura 2.	Incremento del suministro de oxígeno a los tejidos	13
Figura 3.	El efecto de la mayor transferencia de oxígeno a los tejidos durante el paso de los glóbulos rojos	14
Figura 4.	Estimulación de glutatión peroxidasa y glutatión reductasa por metabolitos del ozono	15

III. Índice de Tablas

Tabla 1.	Características morfológicas y bioquímicas de <i>Staphylococcus aureus</i> sobre medios selectivos-diferenciales	31
Tabla 2.	Características morfológicas y bioquímicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre medios selectivos-diferenciales	32
Tabla 3.	Recuento de mesófilos aeróbios	36
Tabla 4.	Evaluación del grado de preservación	37
Tabla 5.	Recuento de mesófilos aeróbios a los 7 meses	38
Tabla 6.	Evaluación del grado de preservación	38
Tabla 7.	Evaluación de recuento de mesófilos aeróbios y grado de preservación en dos cremas comerciales (muestras control)	39

1. INTRODUCCIÓN.

A nivel industrial en México los Sistemas de Calidad se han ido generando en base a experiencias derivadas en los países de mayor desarrollo e industrializados. La Calidad se define como: El conjunto de características de un producto o servicio que cumple y satisface las necesidades de un consumidor o cliente (Grado de Satisfacción para bienestar del consumidor). El control de calidad consiste en una evaluación sistemática del trabajo, para asegurar que el producto final se ajusta hasta un grado aceptable, a límites de tolerancia previamente establecidos. La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) especifica métodos generales de análisis para la evaluación de límites de calidad de los productos farmacéuticos.

El proceso de control de calidad implementado a lo largo de toda la secuencia de pasos en la elaboración de un medicamento, permite poner a la disposición del público, productos que cumplan con los requisitos establecidos en la Ley General de Salud para poder ser: eficaces, seguros, inocuos y libres de contaminación bacteriana. Por esta razón las pruebas biológicas y microbiológicas son muy diversas, dependiendo del origen de la materia prima, forma farmacéutica, etc., exigiendo cierto grado de especialización y competencia. Estas pruebas se aplican principalmente a materiales de origen animal, vegetal, mineral y biológico, puesto que la presencia de una gran variedad de levaduras, hongos y bacterias pueden ocasionar una serie de problemas como: la descomposición del principio activo, cambios en el color, olor, textura, ruptura a emulsión y daños al consumidor.

Los requisitos generales de calidad microbiológica son: Cuenta total de bacterias mesófilas aerobias (límite microbiano) y Ausencia de microorganismos patógenos. La prueba de límite microbiano consiste en determinar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de microorganismos aerobios presentes por gramo o mililitro de muestra, esta consiste en inocular la muestra a ensayar en placas o tubos conteniendo medio digerido de soya caseína, se incuban a 35°C durante 72 horas.

El número de microorganismos no debe ser mayor al especificado en metodología. Mucho más importantes que el número total, son los tipos de microorganismos presentes, sobre todo los que deterioran el producto o son nocivos para la salud.

La determinación de microorganismos patógenos, consiste en inocular sobre medios nutritivos la muestra dispersa en un líquido estéril e incubar por 48 horas. Posteriormente se inocular sobre medios selectivos útiles para identificación preliminar, determinando aquellas colonias cuyas características morfológicas correspondan a los microorganismos sospechosos, complementando la prueba con sus características microscópicas y confirmándose con pruebas bioquímicas.

Los metabolitos del ozono tienen evidenciada científica en muchas investigaciones de laboratorio. Sus aplicaciones en seres humanos iniciaron en 1982, cuando los investigadores Rainbauer, Streichsbiers, Washuttl demuestran su marcada actividad biológica, antiséptica y oxigenante¹. Los metabolitos del ozono pueden prepararse en diferentes formas: emulsiones lipofílicas, cremas, óvulos y supositorios. Estas presentan actividades biológicas locales y efectos terapéuticos específicos, dependiendo del lugar de aplicación y el contenido de metabolitos de ozono. Por otra parte, una de las ventajas de estos productos, es que producen efectos terapéuticos similares a los de la ozonoterapia sistémica, con la comodidad de aplicarlos en casa.

RESUMEN.

El presente trabajo, es un análisis microbiológico que se utilizó para evaluar la calidad de dos cremas: Flebozon y Dermozon, hechas a base de metabolitos del ozono para el tratamiento en problemas de la piel. Estas cremas presentan actividades biológicas locales y efectos terapéuticos específicos, dependiendo del lugar de aplicación y el contenido de metabolitos de ozono, una de las ventajas de estos productos es que producen un efecto antiséptico (Flebozon) y un efecto bactericida (Dermozon).

El análisis microbiológico consistió en evaluar el límite microbiano: método general de análisis de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos el cual se basa en la determinación de recuento de mesofilos aeróbios y microorganismos objetables. Además de la prueba de efectividad de preservativos antimicrobianos; el propósito de esta prueba, es evaluar la actividad antimicrobiana del preparado farmacéutico. Pues bien, la evaluación de calidad de las cremas Flebozon y Dermozon, demostró que no presentan crecimiento bacteriano de mesofilos aeróbios, hongos filamentosos y patógenos, por lo que el límite microbiano fue menor a 10 UFC/mg de muestra. En la prueba de preservación se observó actividad bactericida, ya que hubo una recuperación menor de los microorganismos control. Esto es notable por la disminución del crecimiento bacteriano a los 60 min con una recuperación de tan solo 24 UFC para Flebozon y 3 UFC para Dermozon. Se evaluaron a los 7 meses y esta prueba recupera alrededor de 99% de UFC inoculado, se asume que pierde capacidad bactericida. A los 7 meses siguen sin presentar contaminación de mesofilos aeróbios y hongos filamentosos.

Cabe mencionar que las cremas Flebozon y Dermozon aunque tienen propiedades terapéuticas, no son considerados medicamentos, por lo que no existe un procedimiento de calidad para su comercialización, sin embargo la empresa requiere de estos análisis como parte de su investigación en lo que respecta a buenas prácticas de fabricación con el objetivo de comercializar productos de calidad y competitivos en el mercado. Además que el empleo de los metabolitos del ozono es uno de los descubrimientos más notable durante los últimos años en el campo de la medicina alternativa.

1.1. OZONO TERAPÉUTICO.

El ozono es la unidad alotrópica del oxígeno, constituido por moléculas triatómicas de este elemento. Su existencia fue reportada en 1785 por el Químico Holándes M. Von Muran pero no fue hasta 1840 que el Químico alemán Christian F. Schonbien¹ quien asoció el olor producido por descargas eléctricas atmosféricas; con el olor de un gas que se formaba en la electrólisis del H₂O, al cual llamó Ozono, que en griego significa oloroso. Este no puede olerse cuando su concentración supera 0.1 ppm, por que comienza a ser un gas irritante. El mismo posee un poder oxigenante mucho mayor que el del oxígeno normal y su reacción con los compuestos orgánicos es mucho más selectivo y puede reaccionar con algunos de ellos, sin afectar a los demás. Estimula diferentes sistemas enzimáticos protectores del organismo. Además mejora las propiedades de la sangre y su circulación a través de los capilares, aumentando la capacidad de absorción del oxígeno en los eritrocitos, así como su transferencia hacia los tejidos, lo que permite que aumente el metabolismo en el área dañada donde se aplique, permitiendo así su pronta regeneración. Ha sido postulado que los mecanismos de acción de este agente están relacionados con la generación de productos secundarios en su interacción con los dobles enlaces carbono-carbono presentes en los compuestos orgánicos que se encuentran en el plasma y en las membranas celulares, teniendo cuatro efectos fundamentales: mejora el metabolismo del oxígeno, es modulador inmunológico, es modulador del estrés oxidativo biológico, potente bactericida, fungicida y virucida.¹

En 1857, Werner Von Siemens construyó el primer generador de ozono (O₃), cuyo funcionamiento se basaba en el principio de la descarga constante de una chispa y, simultáneamente, el paso de aire u oxígeno a través del campo eléctrico. En 1898, Incluso antes de que Brodie y Ladenburg descubrieran la fórmula molecular del ozono (O₃), Labbe y Qudin, Bontemps y Pfannenstiel, investigaron el efecto bactericida de este “gas de olor acre”. En los años siguientes, se produjeron grandes cantidades de ozono (O₃) (200 l/h; 44 galones/h), en potentes generadores que se utilizaron para la esterilización del agua potable, pero debido a su alto costo se sustituyó por el cloro. En 1916, A. Wolff utilizó sistemáticamente los efectos bactericidas del ozono (O₃) para tratar fracturas conminutas, heridas supurantes malolientes, gangrenas caseosas y flegmones. Fisch fue el primero en utilizar, en 1934, la terapia con ozono - oxígeno en odontología, al tratar con éxito periodontitis, granulomas dentales y otros focos inflamatorios. La generalización del ozono como agente terapéutico en odontología o en medicina, se vio limitada porque el ozono (O₃) corroía los tubos flexibles que

eran fabricados en caucho natural. Más adelante, los tubos se fabricaron de silicona que es más resistente, eliminando su antigua desventaja.²

En la actualidad hay 2 sistemas generadores de ozono (O_3): Ozonytron y Healozone^{KaVo}. El "Healozone", genera ozono a partir de aire que, el cual, es una mezcla de nitrógeno (~ 79%) y oxígeno (~21%). El ozono (O_3) es conducido a través de un tubo flexible de silicona, hasta el punto que será tratado y una vez allí, sale bajo una cápsula de goma. Si la cápsula de goma no está herméticamente ajustada alrededor del objeto a tratar (diente), el generador no funcionará, medida razonable, teniendo en cuenta que el Healozone genera una elevada concentración de ozono (O_3) que sobrepasa la concentración necesaria para la esterilización. Así pues, el exceso de ozono (O_3) es aspirado de nuevo y reactivado en el interior del aparato, es decir, vuelve a convertirse en oxígeno atmosférico.²

1.2. TOXICIDAD DEL OZONO

El ozono es un gas de color azul tenue, lo que explicaría el color azul del cielo y de los mares. A la temperatura de $-111,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ se presenta en estado líquido (temperatura de condensación) con un color azul oscuro y a la temperatura de $-193\text{ }^{\circ}\text{C}$ se presenta en estado sólido y adquiere un color rojo oscuro. Su densidad en estado líquido, a $-182\text{ }^{\circ}\text{C}$, es de $1,572\text{ g/cm}^3$ y su masa en estado gaseoso, a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 1 atm. , es de $2,144\text{ g}$. Su solubilidad en agua es 50% superior a la del oxígeno, el cual es un oxidante lento, mientras que el ozono es un oxidante rápido; es altamente tóxico por vía respiratoria, ya que deteriora la membrana alveolar. Es muy inestable en los estados líquido y sólido. Sin embargo también en el estado gaseoso el ozono es muy inestable, sobre todo en concentraciones altas y en presencia de agua, por la presencia de enlaces de tipo endotérmicos entre los átomos ($H = 34\text{ Kcal/mol}$). Con concentraciones del 20% pueden generarse fenómenos de autoencendido, que no se evidencian por debajo del 8% ; sin embargo, la velocidad de descomposición depende de la temperatura (a 25° se degrada el 60% en una hora). Por eso el ozono médico debe producirse en el momento del uso y guardarse por un periodo breve de tiempo.³

Muchos estudios anteriores han indicado claramente que la toxicidad del ozono puede ser explicada en términos de reacciones de radicales libres. Al ozono se le consideran propiedades radiométricas y, por tanto, de inducir la generación de especies reactivas y radicales libres, causando la inducción de aberraciones de cromosomas y facilitando las interacciones con los sistemas de defensa antioxidantes. Las reacciones con los ácidos grasos polisaturados en las membranas biológicas, la inducción de la peroxidación lipídica y la salida de metabolitos

biológicamente activos como el ácido araquidónico, pueden jugar un papel tanto en la toxicidad citolítica aguda del gas y el desarrollo de la toxicidad crónica, como en la inducción de la inflamación³.

La exposición de animales al ozono causa efectos en la morfología del pulmón y su función, como también inflamación y una resistencia decreciente a los agentes infecciosos. Los efectos del ozono pueden también verse en el timo y en tejidos linfoides después de una severa exposición³.

Gardner resume las observaciones en animales, que incluyen los efectos de 3 horas de exposición a niveles de ozono tan bajos como 0,08 ppm, aumentando la susceptibilidad a infecciones pulmonares bacterianas en ratones⁴.

La exposición ocupacional a este gas por encima de los niveles límite admisibles, puede causar los siguientes síntomas: tos, irritación de las vías aéreas altas, cosquilleo en la garganta, malestar en el pecho, dificultad o dolor al inhalar profundamente, falta de aire, sibilante, dolor de cabeza, fatiga, congestión nasal, cambios en el campo visual, lagrimeo, disminución en la frecuencia cardíaca (pulso) y en la presión arterial y dermatitis, entre otros. La dosis de ozono que llega a las vías aéreas depende de la concentración de ozono en el aire inhalado, la duración de la exposición y la rápida ventilación del sujeto. No existen evidencias concluyentes, pero los sujetos jóvenes aparentan ser más sensibles que los sujetos mayores y las mujeres pueden ser más sensibles que los hombres⁵.

Los mecanismos para los efectos inducidos de ozono en la función pulmonar son comprendidos muy pobremente. Parece haber distintos mecanismos envueltos, incluyendo irritación sensorial de las vías aéreas altas, causando la inhibición involuntaria de las profundas inspiraciones, constricción bronquial causada por la estimulación de nervios vagos, y la salida de metabolitos del ácido araquidónico de las células epiteliales u otras células en las vías aéreas bajas⁶.

La genotoxicidad y la carcinogenicidad del ozono han sido investigadas en distintos sistemas experimentales. El ozono es genotóxico a altas concentraciones in vitro, ya que han causado mutaciones, aberraciones de tipo cromátidas, cambios de cromosomas familiares y transformaciones neoplásicas. No existe una evidencia convincente de efectos citogenéticos en linfocitos de animales o humanos expuestos; no obstante, en un estudio se indujeron en el pulmón de rata, que fueron expuestas al ozono en concentraciones de 430 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ por 6 horas,

aberraciones cromosómicas del tipo cromátidas. La habilidad del ozono para actuar como promotor de tumores ha sido investigada pero no sustentada.⁷

1.3. EL OZONO COMO BACTERICIDA, FUNGICIDA Y VIRUCIDA

El Ozono (O_3), es un gas extremadamente oxidante, capaz de oxidar a la gran mayoría de los metales de alto grado de oxidación, numerosos componentes orgánicos e inorgánicos²³ lo que le confiere propiedades bactericidas, fungicidas y virucidas. Esta ventaja se fundamenta en la ausencia de colesterol en las membranas celulares de los organismos procariontes, hongos y virus, por lo tanto, son mucho más sensibles que las células eucariotas, lo que otorga una gran ventaja biológica a los seres vivos complejos.

Existen varias hipótesis en cuanto a estas propiedades del ozono. Su propiedad virucida está referida a que tanto ozono como sus peróxidos pueden atacar electrofilicamente al receptor del virus por el par de electrones libres del nitrógeno, modificándolo químicamente en forma tal que se inhibe su condensación con el receptor de la célula (Ej.: el ácido N-ACETILNEURAMINICO) impidiéndose de esta forma la penetración del virus a la célula, e inactivando al mismo. A su vez la célula ya infectada, produce peróxidos de hidrógeno en su acción defensiva, siendo entonces menos tolerante a los peróxidos de ácidos grasos, por lo que puede ser afectada por un aumento de éstos, interrumpiéndose el ciclo reproductivo viral.⁸

El aceite ozonizado es una mezcla de gas con aceite. El gas de ozono se obtiene mediante descargas eléctricas a moléculas de oxígeno. La interacción del ozono con moléculas insaturadas, entre ellas, los aceites vegetales, genera la formación de una mezcla de compuestos químicos tales como ozónidos o 1,2,4- trioxolanos y peróxidos. Al ozonizar los aceites vegetales, el ozono ataca a los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados de los triglicéridos que conforman el aceite vegetal (ácido oleico y linoleico) y de ahí se forman una serie de reacciones que terminan con la formación de los principios activos (ozónidos y peróxidos) los cuales poseen un fuerte carácter germicida, contra virus, bacterias y hongos, haciéndolo útil para el tratamiento de heridas infectadas, fístulas y otros procesos sépticos locales, por el ataque directo al microorganismo.⁸

El descubrimiento de las propiedades bactericidas y cicatrizantes del ozono permitió a los investigadores profundizar en el conocimiento de sus efectos beneficiosos, hasta entonces desconocidos, y en el uso del ozono como terapia curativa en los distintos campos de la medicina. *Kleinmann*, en Alemania, realizó el primer estudio bacteriológico en el que describió el efecto del ozono sobre microorganismos patógenos. La primera constancia bibliográfica de su uso en medicina, data de la primera guerra mundial, cuando el doctor *A. Wolff* comenzó en Alemania a realizar curas con ozono para la limpieza y desinfección de heridas sépticas de guerra. *Payr* en 1935, y *Aubourg* en 1936, utilizaron, por primera vez, mezclas de ozono-oxígeno insuflado por vía rectal para tratar fístulas y colitis ulcerativas. En 1950, *J. Hansler* desarrolló el primer generador de ozono para uso médico, que permitiría la dosificación exacta de las mezclas de ozono-oxígeno. Este hallazgo fue decisivo en la terapéutica, porque era necesario aplicar una dosis adecuada de ozono para evitar la peroxidación excesiva que pudiese ocasionar daño en las membranas de las células. A partir de 1970, comenzaron a vislumbrarse nuevas posibilidades de aplicación del ozono en la práctica médica, y varios equipos de investigación de Alemania, Italia y España, publicaron artículos que informaron sobre métodos, resultados y la evolución de la ozonoterapia como técnica aplicada para distintas patologías.⁹

El ozono actúa como un excelente agente antimicrobiano debido a su elevado poder oxidante, especialmente a nivel sistémico, es capaz de inhibir y destruir microorganismos patógenos como bacterias anaerobias, virus, algas, hongos y protozoos. Todas las enfermedades causadas por estos microorganismos son potencialmente curables con la ozonoterapia. Se ha comprobado que su acción virucida, que se establece a nivel del ciclo reproductivo del virus, motivo por el cual se investiga actualmente su posible utilización como tratamiento alternativo del SIDA. Estas propiedades bactericidas, fungicidas y virucidas, también han permitido la utilización del ozono en la potabilización de aguas, sin que se produzcan residuos tóxicos para la salud humana. En Cuba, se utilizó por primera vez el ozono en 1981, cuando fue probada la efectividad de este agente como bactericida en la desinfección de agua potable contaminada.

1.4. OZONOTERAPIA.

El Ozono es conocido como el Gas de la Vida, debido al papel básico que juega para hacer posible la existencia de los organismos vivos sobre la superficie de la tierra, gracias a la protección que brinda contra la radiación Ultra Violeta letal del sol.

Sin embargo, y aún menos conocido, también el ozono médico, administrado correctamente ofrece a los organismos vivos aeróbios protección contra las perjudiciales oxidaciones por radicales libres (envejecimiento). De este modo, la ozonoterapia es capaz de revitalizar y estimular procesos enzimáticos naturales vitales, protectores y antirradicálicos de las células.

La Ozonoterapia es una tecnología médica muy valiosa, altamente útil en varios campos y contra muchas patologías. El Ozono es un gas, en condiciones atmosféricas normales inestable, debido a su alto nivel de energía. Esta es la razón de porque esta tecnología conlleva la necesidad de equipos sofisticados para su generación, conducción y dosificación, así como instrumentos y procedimientos especiales para su manejo y administración.

Las investigaciones en el campo de la Química, Bioquímica y los fundamentos de los efectos del ozono en sistemas biológicos descubrieron que la existencia del ozono como tal en cualquier sistema biológico es extremadamente breve, debido a la presencia en todos estos sistemas de varias sustancias esenciales que presentan reacciones muy rápidas con este gas. Ejemplos de tales sustancias son la amplia variedad de ácidos grasos insaturados (UFA), presentes en prácticamente todos los sistemas vivos, libres o formando parte de diferentes estructuras lipídicas. Sus dobles enlaces son capaces de reaccionar con el Ozono a velocidades de reacción del orden de 10^6 M. seg. Tales velocidades de reacción causan que, en presencia de tales clases de sustancias, la existencia del ozono será de sólo unas centésimas de segundo. Tomando en consideración las características mencionadas anteriormente, es fácil comprender que los efectos sistémicos de la ozonoterapia, así como la mayor parte de los efectos locales sobre los tejidos, deben lograrse a través de los productos de las reacciones principales, o sea, vía metabolitos del ozono.⁷

Estos metabolitos del ozono son los productos de las reacciones del ozono y/o la descomposición de los ozónidos en condiciones fisiológicas. Tales metabolitos, provenientes de rupturas de cadenas en los ácidos grasos insaturados, son similares a los peróxidos lipídicos endógenos. Estos son de cadena más corta, y consecuentemente de menor peso molecular y mayor carácter hidrofílico. Por ello, son más capaces para penetrar las membranas celulares. La llegada de tales moléculas a la fase citosólica produce la activación de la *glutación peroxidasa*, que las reduce a alcoholes, a expensas del glutati6n reducido (GSH), el cual es, a su vez, oxidado a glutati6n (GSSG). Este paso transcurre con una

diferencia energética de 280 mV y facilita un flujo protónico para las reacciones acopladas. Al mismo tiempo, también la *glutación reductasa* se activa para regenerar el GSH a expensas del NADPH⁹.

Estos descubrimientos están soportados por determinaciones *in vivo* durante ensayos experimentales en animales y humanos, relacionados con los efectos protectores producidos por los metabolitos del ozono en órganos sometidos a procesos de isquemia-reperusión. Para neutralizar el stress oxidativo, la relación GSH«GSSG en el citoplasma se mantiene en un valor de cerca de 97,4:1 por la glutación reductasa activada, acoplada con el sistema NADPH«NADP. Así, ocurre proporcionalmente un aumento correspondiente de la producción de NADPH. La vía principal de producción de NADPH esta constituida por la vía de las pentosas de la glicólisis, y por ello, la misma glicólisis se acelera también, acelerándose así la producción de ATP, causando un incremento de la disponibilidad de energía para las células,⁹ ver figura 1.

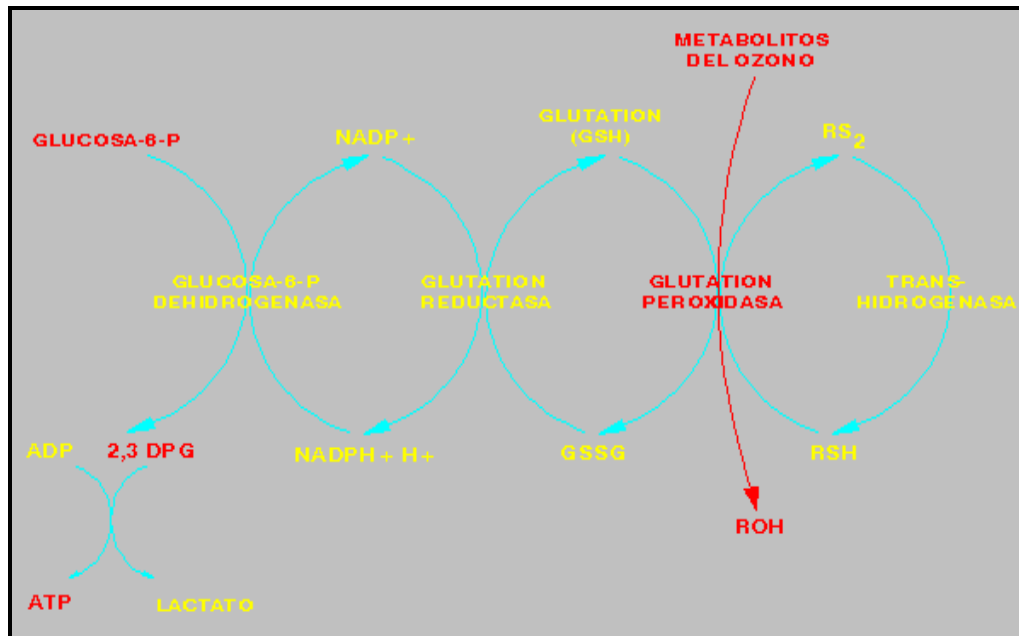


Figura 1. Mecanismo del incremento de la disponibilidad de energía para las células.

La consecuente aceleración del recambio del GSH y la glicólisis es la consecuencia final del efecto de los mencionados hidroperóxidos de cadena corta. Estos efectos producen también mayor disponibilidad de energía para las células en forma de ATP. También la producción de 2,3-DPG aumenta, aumentando así la liberación de Oxígeno a partir de la oxihemoglobina, incrementando por ello la oxigenación tisular.⁷

Es conocido que el aumento en la disponibilidad y velocidad de recambio del GSH en las células es un factor importante para la efectividad de los mecanismos que protegen a las mismas contra radicales libres y peróxidos. Además, también es conocido que el sistema redox dependiente del GSH está también básicamente involucrado en otros importantes procesos como:

- Protección de las enzimas tiólicas microsomales y la catepsina.
- Protección de la exokinasa (en condiciones de baja concentración de GSH esta enzima reduce su actividad y así disminuye también la síntesis de ATP).
- Participación en los procesos de respiración de los núcleos celulares a través del sistema GSH-ácido ascórbico.

También el GSH esta determinadamente involucrado en procesos básicos de detoxificación celular como:

- ✓ Reacción Glioxálica (hidratación de substratos cetoaldehídicos, inactivación del aldehído pirúvico a ácido láctico, síntesis de porfirinas de g-dioxivalerato).
- ✓ Secuencia catabólica aminoácidos aromáticos.
- ✓ Deshidrogenación de formaldehído a ácido fórmico.
- ✓ Detoxificación a través de biosíntesis de ácidos mercaptúricos con bajo consumo de ATP.

Y en síntesis proteica:

- ✓ Suministro trans membrana de aminoácidos a través de g-glutamyl-transpeptidasa de membrana.
- ✓ Promoción de la reducción de ribonucleotidos-desoxiribonucleotidos a precursores del DNA.
- ✓ Estimulación de la propia síntesis de DNA.
- ✓ Mantenimiento de la estructura doble hélice del DNA, matriz de síntesis proteica.

1.5. APLICACIÓN DE DERIVADOS DE ACEITES NATURALES CON OZONO:

La existencia de los metabolitos del ozono ha sido evidenciada en muchas investigaciones de laboratorio, así como el hecho de muchos de ellos son más estables que el ozono mismo. Por otra parte, también se conoce que algunos productos de las reacciones químicas normales del ozono con productos similares son menos estables que el ozono, hasta el extremo de descomponerse de manera espontánea explosivamente. Así, la llave de la generación selectiva de metabolitos del ozono útiles radica en las condiciones, las sustancias catalizadoras y el orden en que las reacciones tienen lugar.

Sobre las bases precedentes, puede perfectamente concebirse que sea posible generar metabolitos del ozono también *in vitro*, y que su estructura y estabilidad podrá semejarse más a los metabolitos del ozono *in vivo*, mientras más nos sea posible acercarnos a reproducir las condiciones de los tejidos vivos para las reacciones del ozono, tal como ocurre en la ozonoterapia clásica.¹⁰

Con el objetivo de determinar las características químico-físicas óptimas para la obtención de los metabolitos del ozono más estables y biológicamente activos han sido aprovechadas extensivas investigaciones en esa dirección. Muchas sustancias biológicas diferentes, catalizadores en trazas, coadyuvantes, etc. fueron combinadas en múltiples formas de reacciones con ozono y sus productos fueron consecuentemente analizados y sometidos a ensayos de estabilidad, actividad biológica, así como de toxicidad, para lograr la mayor estabilidad química y bioactividad, libre de efectos secundarios tóxicos.

Así, se han diseñado tecnologías optimizadas para obtener formulaciones de ozono-derivados de sustancias naturales que poseen buena estabilidad, las cuales han mostrado marcada actividad biológica, y que han pasado satisfactoriamente los ensayos de toxicidad establecidos internacionalmente (LD50 oral e intraperitoneal, irritación oftálmica y dérmica, sensibilización, fototoxicidad, mutagenicidad, teratogenicidad, etc.). Ejemplo de estos derivados es un tipo particular de los comúnmente llamados aceites ozonizados, especialmente preparado de acuerdo a los postulados precedentes. Este puede prepararse en diferentes formas: líquido oleoso, emulsiones lipofílicas e hidrofílicas y cremas, ungüentos, óvulos, supositorios, cápsulas blandas, etc. Estas presentan actividades biológicas locales y efectos terapéuticos similares a los del ozono administrado *in vivo*¹⁰.

Entre las propiedades terapéuticas de esta clase de aceite ozonizado, puede resaltarse, en relación con algunos de sus efectos locales, los siguientes:

- ✓ Alta actividad germicida general (antimicótica, antibacteriana, antiviral).
- ✓ Activación de la microcirculación local.
- ✓ Mejoramiento de la metabolización celular del oxígeno.
- ✓ Estimulación del crecimiento del tejido de granulación y epitelización.
- ✓ Revitalización del tejido epitelial.

Esta forma de aplicación local de metabolitos del ozono es muy apropiada para muchos de los tipos de patologías tratadas tradicionalmente por ozonoterapia, y se logran resultados similares, aunque a veces, se necesitan períodos de tratamiento algo más largos, probablemente debido al más bajo poder oxigenante y/o al menor efecto sistémico. Por otra parte, una de las ventajas que tienen sobre el ozono mismo es la posibilidad de aplicar la ozonoterapia "en casa", no requiriendo la presencia física de los pacientes en el lugar donde tienen que ser aplicados los tratamientos con ozono gaseoso. Esto puede también combinarse con las aplicaciones de ozono gas, durante los períodos entre sesiones de ozonoterapia¹⁰.

Ejemplos de las entidades en las cuales se han logrado buenos resultados son, entre otros, los siguientes:

- ✓ Acné.
- ✓ Atenuación de arrugas.
- ✓ Dermatitis y manchas de la piel.
- ✓ Celulitis y piel deteriorada.
- ✓ Escaras, fistulas y heridas post quirúrgicas.
- ✓ Úlceras gástricas
- ✓ Giardiasis
- ✓ Gingivoestomatitis.
- ✓ Úlceras de los miembros inferiores (insuficiencia venosa o arterial).
- ✓ Infecciones vulvovaginales.
- ✓ Quemaduras de la piel.
- ✓ Herpes simplex labialis y genitalis recidivantes.
- ✓ Otitis externa crónica.

- ✓ Onicomicosis.
- ✓ Epidermofitosis:
- ✓ Conductos radiculares dentales infectados.
- ✓ Hiperestesia dental.

Importantes resultados logrados a través de mediciones objetivas, durante varios ensayos clínicos realizados acerca de diferentes patologías se presentan a continuación, como confirmación de las afirmaciones precedentes⁷.

1.6. INCREMENTO DEL SUMINISTRO DE OXÍGENO A LOS TEJIDOS:

Los metabolitos del ozono producidos por la interacción con las membranas celulares son capaces de penetrarlas y allí estimular varios procesos bioquímicos básicos. Uno de sus efectos es incrementar la producción de 2,3 DPG, el cual se sabe que facilita la liberación de oxígeno a partir de la oxihemoglobina, a nivel de tejidos⁷, vea la Figura 2 (destacado en rojo):

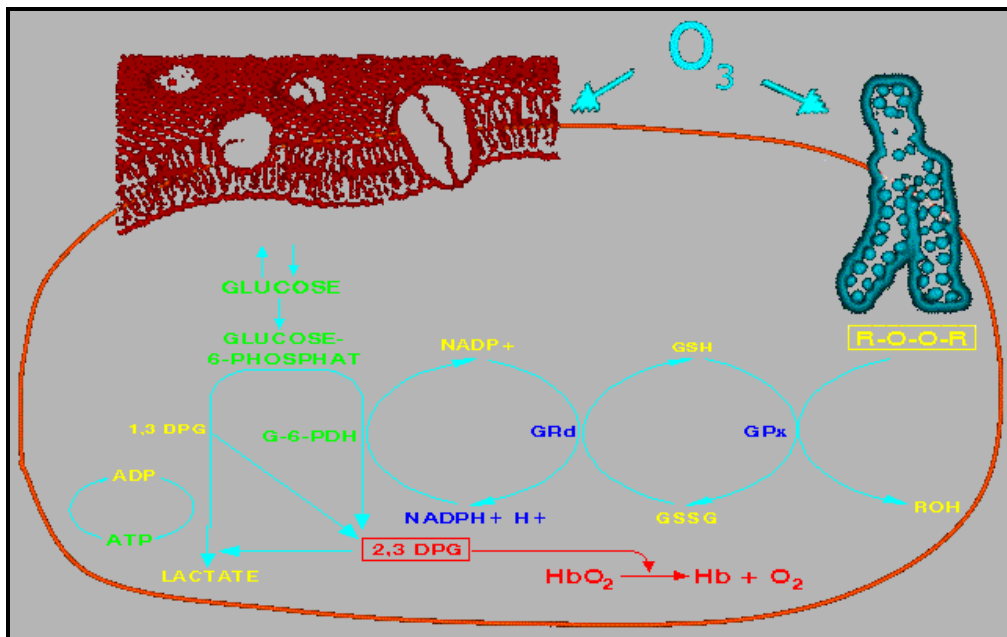


Figura 2. Incremento del suministro de oxígeno a los tejidos:

La demostración experimental de este efecto puede observarse en los resultados mostrados en la siguiente Figura 3, que corresponden a un estudio clínico con 20 pacientes tratados con ozonoterapia, durante el cual se midió el 2,3 DPG en glóbulos rojos, y también el ácido úrico (UA) en el plasma.

Este último da una medida del nivel de oxidantes circulantes. Como puede observarse, el 2,3 DPG aumenta significativamente, con lo cual la oxihemoglobina cede más oxígeno a los tejidos, mientras que el UA disminuye, indicando la disminución del nivel de oxidantes circulantes. Todo ello conlleva una notable mejoría del estado de las células⁹.

El efecto de la mayor transferencia de oxígeno a los tejidos durante el paso de los glóbulos rojos a través de los microvasos capilares puede ser comprobado por la evidente disminución de la PO_2 venosa, tal como se ve en la Figura 3:

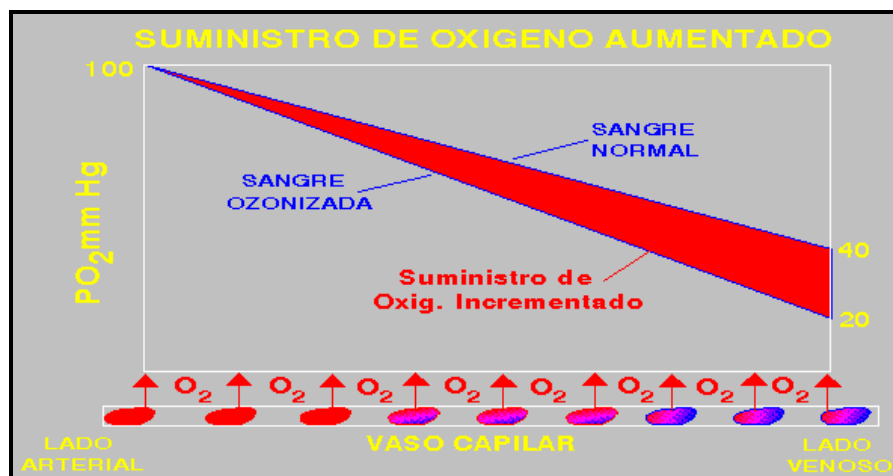


FIGURA 3. El efecto de la mayor transferencia de oxígeno a los tejidos durante el paso de los glóbulos rojos.

Tal como se ve en la figura 3, el incremento en 2,3 DPG facilita la cesión de oxígeno atrapado en la oxihemoglobina en los glóbulos rojos. Así cuando estos pasan a través de los microvasos capilares de los tejidos, de la sección arterial a la venosa, ellos son más capaces de transferir más oxígeno al tejido circundante. Esto puede ser comprobado por la disminución de la presión parcial de oxígeno de la sangre venosa, la cual es pobre de oxígeno transportado, incrementando, de este modo, su eficacia⁷.

1.7. ESTIMULACIÓN DE LAS DEFENSAS ENZIMÁTICAS (ANTI-RADICALES, ANTI-DEGENERATIVAS, ANTIENVEJECIMIENTO):

La capacidad de los metabolitos del ozono (ozonoterapia) para estimular las enzimas relacionadas con los procesos de oxidación-reducción es muy importante para aumentar la capacidad protectora de las células contra oxidantes agresivos y radicales libres. Los metabolitos del ozono interaccionan con los principales procesos enzimáticos concatenados del sistema defensivo celular y lo estimulan significativamente. El último eslabón en la cadena defensiva contra los oxidantes es el Sistema Redox del Glutatión, el cual se activa por los metabolitos del ozono¹¹, tal como se muestra en la Figura 3 precedente (destacado en azul).

Este efecto ha sido medido en diferentes estudios clínicos. Los resultados típicos se muestran en la Figura 4:

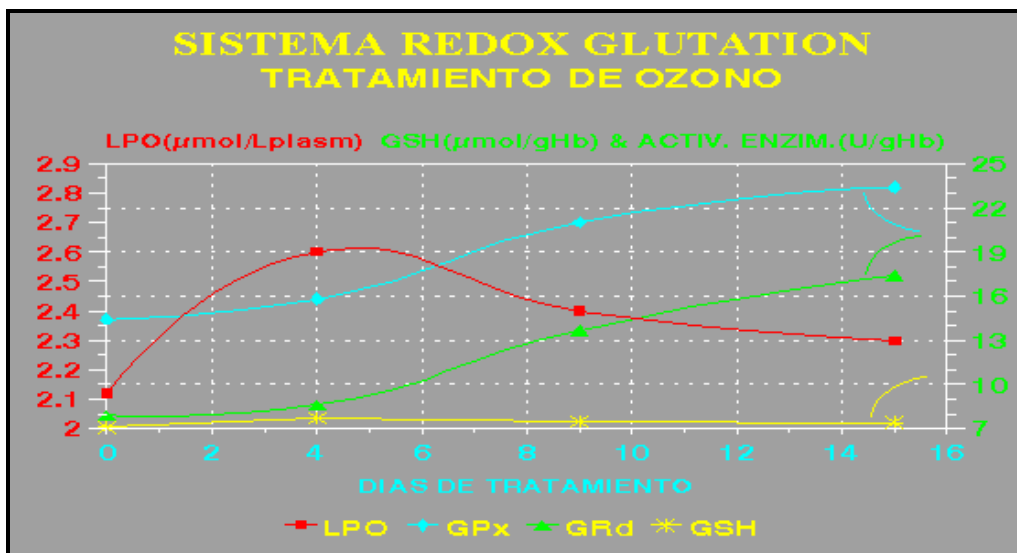


Figura 4. Estimulación de glutatión peroxidasa y glutatión reductasa por metabolitos del ozono

En el ejemplo anterior, puede verse como al inicio del tratamiento de ozonoterapia, los *lipoperóxidos sanguíneos* LPO (curva roja) se incrementan ligeramente hasta el quinto día, a partir del cual, debido a la activación de la *glutatión peroxidasa* GPx (curva azul), la cual los inactiva, dejan de aumentar y comienzan a disminuir de nuevo. La *glutatión reductasa* GRd (curva verde) se estimula también, tal como se necesita para reponer el pool de glutatión reducido, necesario para la actividad aumentada de la GPx. Es fácil notar como el glutatión reducido (curva amarilla) se mantiene prácticamente constante, corroborando el equilibrio

alcanzado. Otras enzimas del sistema defensivo básico como *superóxido dismutasa*, *catalasa*, *glucosa-6-fosfato dehidrogenasa*, etc. son también consecuentemente estimuladas. Ellas son responsables de la metabolización (inactivación) de aniones superóxido, peróxido de hidrógeno, peróxidos lipídicos, etc., así como para la reposición de equivalentes reducidos como NADPH+ y otros.¹¹ De este modo, la capacidad general de las células para defenderse de radicales y oxidantes resulta significativamente incrementada, y también su capacidad para luchar contra procesos de envejecimiento y algunas enfermedades. La mayor disponibilidad de ATP permite a las células restaurar ó mejorar funciones básicas ya perdidas o deprimidas.

Como se sabe, la actividad fagocítica de ciertas células especializadas consiste en su capacidad para atrapar e inactivar microorganismos externos invasores y sustancias extrañas, para evitar el daño que estos podrían causar en las células normales.⁷ Esta es una parte muy importante de las defensas del organismo contra enfermedades y deterioro general.

1.8. PRODUCTOS ANALIZADOS.

COMPAÑÍA MEXICANA

La existencia de los metabolitos del ozono ha sido evidenciada en muchas investigaciones de laboratorio. Sus aplicaciones en seres humanos inicio en 1982, cuando los investigadores Rainbauer, Streichsbiers, Washuttl demuestran su marcada actividad biológica, antiséptica y oxigenante.

Los metabolitos del ozono pueden prepararse en diferentes formas: emulsiones lipofílicas, cremas, óvulos y supositorios. Estas presentan actividades biológicas locales y efectos terapéuticos específicos, dependiendo del lugar de aplicación y el contenido de metabolitos de ozono. Por otra parte, una de las ventajas de estos productos, es que producen efectos terapéuticos similares a los de la ozonoterapia sistémica, con la comodidad de aplicarlos en casa.¹² Estos son los dos productos farmacéuticos que elabora esta empresa, los cuales se analizaron como una parte de su investigación de calidad de ambos:

1.8.1. Flebozon:

Es una crema útil en el tratamiento de úlceras varicosas de difícil cicatrización, ya que, ayuda a producir tejido de granulación, al activar la micro-circulación local y el crecimiento de células formadoras de tejido, además que, produce un aumento de la oxigenación local y tiene un efecto antiséptico¹³. Flebozon es coadyuvante en el tratamiento de las siguientes enfermedades: Úlceras varicosas, Úlceras arteriales, Úlceras de decúbito, Escaras, Lesiones de difícil cicatrización.

Compuestos activos: Aceite de coco, 20 mg de hidroperóxidos de ácidos grasos.

Dosis y modo de empleo: Lave, previamente, la úlcera y aplique, perfectamente, FLEBOZON en la parte afectada, tres o cuatro veces al día.

Vía de administración: Tópica. No ingerible.

Precaución y advertencias: Consérvese en refrigeración de 0°C a 4°C. No se congele. No se deje al alcance de los niños. Evite el contacto con los ojos.

1.8.2. Dermozon:

Es una crema hecha a base de aceite de coco y metabolitos de ozono, los cuales poseen un marcado efecto bactericida y oxigenante. La cantidad de los metabolitos contenidos en DERMOZON han demostrado que al contacto con las membranas celulares de la piel, rompen la excesiva fuerza de cohesión entre las células vecinas permitiendo así mayor flexibilidad y suavidad en la piel¹³. Dermozon es coadyuvante en el tratamiento de los siguientes problemas de la piel: Acné, Infecciones cutáneas, Manchas en la piel, Eczemas, Impétigos.

Compuestos activos: Aceite de coco, 50 mg de hidroperóxidos de ácidos grasos.

Dosis y modo de empleo: Lave, previamente la cara con un jabón neutro y evite secar la piel antes de aplicar la crema. Aplíquese, preferentemente, por la noche.

Vía de administración: Tópica. No ingerible.

Precaución y advertencias: Consérvese en refrigeración de 0°C a 4°C. No se congele. No se deje al alcance de los niños. Evite el contacto con los ojos.

Estos dos productos no son un medicamento, su empleo es responsabilidad de quien lo usa y lo recomienda.³¹

1.9. ANTISÉPTICOS.

Diferencia entre desinfección y antisepsia

Desinfección: Es la destrucción de microorganismos patógenos en superficies inanimadas o inertes mediante la utilización de productos químicos denominados desinfectantes.

Antisepsia: Es la destrucción de microorganismos patógenos en tejidos vivos (piel, tracto genital, heridas...) mediante la aplicación de productos químicos llamados antisépticos.

Un antiséptico es un producto químico que se aplica sobre los tejidos vivos con la finalidad de eliminar los microorganismos patógenos o inactivar los virus. No tienen actividad selectiva ya que eliminan todo tipo de gérmenes.

1.9.1. Recomendaciones para la utilización de los antisépticos:

- ✓ Evitar la utilización de dos o más antisépticos.
- ✓ Respetar el tiempo de actuación y la concentración indicada por el fabricante, así como su eficacia frente a materia orgánica.
- ✓ Hay que evitar los recipientes de más de medio litro de capacidad. Son recomendables los sistemas de monodosis.
- ✓ Para minimizar el grado de contaminación, hay que guardar los recipientes cerrados. En el caso de tener que utilizar envases grandes, se recomienda verter previamente en un recipiente pequeño la cantidad de antiséptico que se estime necesario. Desechar el producto del envase pequeño que no se haya utilizado.
- ✓ También se puede aplicar directamente el antiséptico sobre una gasa, evitando el contacto directo de ésta o de la piel con el envase.
- ✓ Los envases opacos mantienen en mejores condiciones las preparaciones de antisépticos.
- ✓ Hay antisépticos que se inactivan por jabones aniónicos, de gran uso en ambiente doméstico para la ducha, limpieza de manos, etc. Es importante recordar esta premisa. cuando se realice la limpieza de la herida con sustancias jabonosas.

El **antiséptico ideal** debería cumplir con los siguientes atributos clave:

- ✓ Amplio espectro de actividad.
- ✓ Baja capacidad de generar resistencias.
- ✓ No ser tóxico para los leucocitos en la fase inflamatoria temprana del proceso de cicatrización ni para fibroblastos y queratinocitos en fases más tardías.
- ✓ Tener un inicio de actividad rápido
- ✓ No ser ni irritante ni sensibilizante.
- ✓ No teñir los tejidos.
- ✓ Ser efectivo, incluso ante la presencia de pus, exudado, tejido esfacelado.

1.10. ALGUNAS INFECCIONES DE LA PIEL Y DE LOS TEJIDOS BLANDOS

La piel está formada por dos capas: la capa superficial es una cubierta fina, la epidermis, que está en contacto con el medio exterior. Por debajo de la epidermis se encuentra una capa más gruesa, la dermis, que contiene muchas estructuras especializadas, como folículos pilosos y glándulas sudoríparas. Por debajo de la dermis se encuentra una capa de grasa, el tejido subcutáneo.¹⁴

La epidermis es una capa de células muy activas. Las que se encuentran en su base se están dividiendo continuamente para producir nuevas células, que van muriendo a medida que se van cubriendo de queratina. Cuando mueren son eliminadas de la superficie cutánea mediante la descamación o al desprenderse con el roce de la ropa. La producción continua de células en la base de la epidermis está en equilibrio con la pérdida. Se tarda un promedio de un mes para que una célula epidérmica complete el trayecto desde la base hasta la superficie.¹⁴

La piel realiza las siguientes funciones: regulación de la temperatura corporal; protege los tejidos subyacentes de la abrasión física, invasión bacteriana, deshidratación y radiación ultravioleta; recepción de estímulos; excreción de agua, sal y compuestos orgánicos y síntesis de vitamina D.

1.10.1. Las manchas en la piel

Las enfermedades de la piel se manifiestan más por signos que por síntomas, entre estos apenas tenemos al prurito, el dolor y los trastornos de la sensibilidad, evidentemente subjetivos, en cambio los signos son muchos y constituyen lo que llamamos lesiones dermatológicas elementales.¹⁵

Las lesiones dermatológicas elementales son los signos con los que se expresan todas las enfermedades de la piel, como si fueran las “letras” del alfabeto dermatológico, sin conocerlas no podemos “leer” en la piel. Son entre 18 y 20 según varios autores y las dividimos en primitivas si aparecen sobre una piel normal y secundaria cuando asienta sobre las primitivas.¹⁵

Cuadro explicativo de las lesiones dermatológicas elementales:

- Levantamiento de contenido líquido:
 - ✓ Primitivas: Mancha, Vesícula, Ampolla, Pústula, Absceso.
 - ✓ Secundarias: Costra, Escama, Escara, Ulceración, Cicatriz, Esclerosis.

- Levantamiento de contenido sólido:
 - ✓ Primitivas: Pápula, Nódulo-goma, Nudosidad, Roncha.
 - ✓ Secundarias: Atrofia, Liquenificación, Verrugosidad, Vegetación, Neoformación.

1.10.2. Acné vulgar; acné quístico; granos

Es una condición inflamatoria de la piel caracterizada por erupciones cutáneas alrededor de los folículos pilosos. El acné se presenta con mayor frecuencia en los adolescentes, pero puede ocurrir a toda edad. La condición comienza usualmente en la pubertad y puede continuar por muchos años. Tres de cada cuatro adolescentes presentan acné hasta cierto grado, causado probablemente por cambios hormonales que estimulan las glándulas sebáceas de la piel (productoras de grasa).¹⁶

El acné se produce cuando los poros de la piel se obstruyen porque la grasa y las células de la piel se acumulan más rápido de lo que pueden salir. La obstrucción ocasiona un abultamiento del folículo (causando puntos blancos) y la parte superior de la obstrucción se puede oscurecer (causando puntos negros). Si la obstrucción causa una ruptura en la pared del folículo, las células muertas de la piel, la grasa y las bacterias, encontradas normalmente en la superficie de la piel, pueden penetrarla y formar pequeñas áreas infectadas llamadas pústulas (también conocidas como granos). Si estas áreas infectadas están en lo profundo de la piel, pueden aumentar en tamaño hasta formar quistes firmes y dolorosos.¹⁶

El tratamiento está dirigido a prevenir la formación de nuevas lesiones y curar las lesiones anteriores. Los medicamentos tópicos secan la grasa y promueven el desprendimiento de la piel. Pueden contener peróxido de benzoil, azufre, resorcinol, ácido salicílico o derivados de la vitamina A (retinoides). La exposición al sol en períodos cortos puede aliviar el acné; sin embargo, no se recomienda la exposición excesiva a la luz solar o rayos ultravioleta porque ello incrementaría el riesgo del cáncer de piel.⁴

1.10.3. Escara de decúbito; úlcera de presión.

Es un área de piel que se destruye cuando una persona permanece en una sola posición por mucho tiempo sin desplazar el peso. Esto con frecuencia sucede cuando la persona está postrada a una silla de ruedas o a una cama aún por un corto período de tiempo (por ejemplo, después de una cirugía o lesión). La presión constante sobre la piel produce una disminución en el suministro sanguíneo hacia esa área y el tejido afectado muere.⁶

Una úlcera de decúbito comienza con un enrojecimiento de la piel, pero empeora progresivamente, formando una ampolla, luego una llaga y finalmente un cráter. Los sitios más comunes donde se presentan las úlceras de decúbito son las prominencias óseas (huesos cercanos a la piel), como en los codos, los talones, las caderas, los tobillos, los hombros, la espalda y la parte posterior de la cabeza.⁶

1.10.4. Úlcera Varicosa

La úlcera varicosa representa una herida abierta por debajo de la rodilla, de difícil cicatrización por insuficiencia de las venas. Las úlceras de origen varicoso, de difícil cicatrización, tienden a infectarse, cambiando de coloración de rojiza a violácea, la piel

adyacente se adelgaza y se torna frágil. El diagnóstico y el tratamiento tardío de la insuficiencia de las válvulas en la vena safena son la principal causa para la aparición de úlceras varicosas. Los síntomas incluyen herida roja de mala cicatrización, que se torna violácea, en la región del tobillo, que cursa con hinchazón de la pierna, ocurren usualmente en pacientes con historia de varices no tratadas, o con tratamiento inadecuado.⁶

1.10.5. Úlceras Arteriales

Se pueden definir como aquellas que son consecuencia de un déficit de aporte sanguíneo en la extremidad afectada secundario a una arteriopatía generalmente crónica. También se les conoce como "isquémicas". Su localización preferente en zonas dístales o en la cara antero-externa de la pierna, sobre prominencias óseas, puntos sometidos a presión en los pies, punta de dedos, zonas interdigitales, talón, cabezas de metatarsianos, etc. Suelen tener una evolución crónica, con mal pronóstico debido a la poca respuesta terapéutica y a los sistémicos concomitantes en los enfermos, además de un alto riesgo de infección. El tratamiento es complejo al ser origen del problema una oclusión arterial y mientras no se restaure la circulación difícilmente curará, por lo que la mejor actitud es la prevención.¹⁶

Proceso curativo

Una vez producida una úlcera cutánea se dan tres fases en el proceso de curación:

- ✓ Fase catabólica o de inflamación
- ✓ Fase asimilativa o de reconstrucción. Granulación.
- ✓ Fase de epitelización.

Por este proceso anterior las úlceras se clasifican en:

- ✓ Fase I. Desbridamiento, limpieza.
- ✓ Fase II. Granulación.
- ✓ Fase III. Epitelización.

Fase I. Desbridamiento

Podemos observar en el suelo de la úlcera tejido necrótico en forma de escara o esfacelos. El tejido necrótico está compuesto por colágeno, fibrina, y elastina. Este tejido actúa negativamente en la fase de curación con diferentes actitudes:

- ✓ Obstrucción mecánica a la retracción de los bordes: no fibroblastos
- ✓ Barrera para la epitelización: escara seca no emigración de granulocitos

- ✓ Favorece la aparición de gérmenes patógenos.

Fase II. Granulación

Aspecto brillante, carnosos y rojos a lo que se le denomina mamelones.

Fase III. Epitelización

Aspecto rosa aterciopelado. Todos los productos existentes para la cura de úlceras van encaminados a acelerar el proceso de curación fisiológico.¹⁷

1.10.6. Tratamiento local.

Desbridamiento del tejido necrótico: Es el conjunto de acciones que podemos realizar para conseguir eliminar el material de detritus que se encuentra en el lecho de la úlcera.

Desbridamiento quirúrgico: Se requiere conocimientos, destreza y técnica, en algunos casos analgesia y la complicación más frecuente es la hemorragia.

Desbridamiento enzimático: Se realiza mediante la aplicación tópica de enzimas que actúan sobre la zona necrosada de la úlcera, destruyéndola sin lesionar el tejido sano. Como enzimas desbridantes encontramos cremas como Irujol mono, Parkelase, Furacin.

Desbridamiento autolítico: Se produce por la conjunción de la hidratación del lecho de la úlcera, la fibrinólisis y la acción de las enzimas endógenas sobre los tejidos desvitalizados. Esta clase de desbridamiento lo conseguimos con productos como hidrocoloides, hidrofibras, alginatos e hidrogeles.

Desbridamiento mecánico: Se basa en el uso de compresas húmedas-secas cada 4- 6 horas, de hidroterapia, de lavado de la úlcera y de dextranómeros. Es un método doloroso.

➤ Limpieza de la herida.

Las úlceras deben limpiarse en cada cura con solución salina fisiológica, agua destilada estéril o bien agua corriente y jabón neutro, usando la mínima fuerza mecánica, para eliminar los detritus y el líquido exudado y finalmente realizar un suave secado, tanto del lecho de la úlcera como de la zona periulceral. Es importante no producir traumatismos en el tejido sano al arrastrar los detritus y evitar limpiar la úlcera con antisépticos locales y limpiadores cutáneos porque son productos tóxicos para el nuevo tejido.¹⁸

➤ Prevención de la infección.

Todas las úlceras suelen estar contaminadas por bacterias, sin que esto sea evidencia de que estén infectadas. La simple contaminación bacteriana no requiere de tratamiento antibiótico,

sino que con una limpieza y desbridamiento eficaces evitamos que esa colonización progrese a infección.¹⁸

1.11. PRINCIPAL FLORA PATÓGENA EN FUNCIÓN DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN DEL PRODUCTO.

1.11.1 Infecciones por estafilococos.

El género *Staphylococcus* está constituido por cocos grampositivos con tendencia a agruparse formando racimos. Son inmóviles, dan positiva la reacción de la catalasa. En este género se incluyen 35 especies distintas, de las cuales *S. aureus* es la más importante en patología infecciosa humana. La capacidad de *S. aureus* de coagular el plasma es la principal característica que diferencia esta especie del resto, a las que se denominan conjuntamente Estafilococos coagulasa negativos (ECN). Algunas especies de ECN son agentes etiológicos frecuentes de infección en el hombre, principalmente *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, así como *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus* y *S. schleiferi*.¹⁹

Dado que las infecciones causadas por *S. aureus* son principalmente endógenas, la colonización del hospedador desempeña un papel básico en su epidemiología. El vestíbulo anterior de las fosas nasales es el reservorio principal del microorganismo, desde el que fácilmente alcanza la piel. La colonización es más frecuente en personal hospitalario, en diabéticos insulino dependientes, en pacientes en hemodiálisis o con enfermedades dermatológicas crónicas y en usuarios de drogas parentales.

En la capacidad patogénica de *S. aureus* intervienen, además de su capacidad para diseminarse y multiplicarse en los tejidos del hospedador, algunos elementos de su pared celular y su capacidad de sintetizar numerosas enzimas y toxinas. El componente básico de la pared de *S. aureus* es el peptidoglicano. Representa el 50% del peso de la pared celular y proporciona forma y estabilidad al microorganismo. Además, tiene importantes propiedades biológicas: presenta actividad endotóxica, desencadena la producción de interleucina 1 por los monocitos, estimula la quimiotaxis y la agregación de los leucocitos, activa el complemento e induce la producción de anticuerpos opsonizantes.¹⁹

Otros componentes importantes de la pared celular son los ácidos teicoicos, que representan hasta el 40% de su peso. Son polímeros de fosfato específicos de especie, que pueden estar unidos covalentemente al peptidoglucano de la pared o ligados a los lípidos de la

membrana celular. Los ácidos teicoicos median en la unión de los estafilococos a las superficies mucosas mediante uniones específicas a la fibronectina. Tienen la capacidad de inducir la producción de anticuerpos. Además, la capa externa de peptidoglucano incorpora, mediante unión covalente, distintas proteínas.¹⁹

- a) Algunas facilitan la adhesividad del microorganismo (proteína fijadora de colágeno, proteína fijadora de fibronectina)
- b) El factor de agregación (clumping factor) o coagulasa ligada a la célula que, mediante su capacidad de unirse al fibrinógeno, facilita la agregación bacteriana.
- c) La proteína A específica de *S.aureus* que, además de activar el complemento, bloquea la fracción Fc de las IgG, por lo que previene la eliminación del microorganismo mediada por anticuerpos.

Por último, muchas cepas de *S. aureus* están recubiertas por una cápsula externa de naturaleza polisacárida, que protege a la bacteria de la fagocitosis por parte de los leucocitos polimorfonucleares y aumenta, en ciertas condiciones, su capacidad de adherencia¹⁸.

Casi todas las cepas de *S.aureus* sintetizan diferentes sustancias como actividad enzimática, entre las que destacan las siguientes¹⁵:

Catalasa. Desdobla el peróxido de hidrógeno, tóxico para el microorganismo, en agua y oxígeno.

Coagulasa. Las cepas de *S.aureus* poseen dos formas de coagulasa ligada, al que se ha hecho referencia al tratar los componentes de la pared celular, y la coagulasa libre o extracelular. Ambas tienen un efecto similar: convertir el fibrinógeno en fibrina. Aunque no se conozca con certeza el papel de la coagulasa, puede inducir la formación de una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico, de forma que la infección quede localizada y protegida de la fagocitosis. La detección de la coagulasa libre es la prueba que diferencia *S.aureus* de los ECN.

Hialuronidasa. Hidroliza el ácido hialurónico, mucopolisacárido que forma parte de la matriz acelular del tejido conectivo.

Penicilinasas. Producida en la actualidad por casi todas las cepas de *S.aureus*, inactiva la penicilina mediante la hidrólisis de su anillo β -lactámico.

Otras enzimas. La mayoría de las cepas de *S.aureus* sintetizan además otras enzimas, como lipasas, nucleasas o enzimas que hidrolizan los ácidos nucleicos y estafilocinasas o sustancias fibrinolíticas.

Algunas cepas de *S.aureus* producen una o más proteínas extracelulares:

Toxinas α , β y γ . Son sintetizadas por la mayoría de las cepas de *S.aureus*. Además de su capacidad hemolítica, pueden afectar a una amplia gama de células eucariotas del hospedador, como leucocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos. La toxina α es la mejor estudiada. Parece intervenir en el desarrollo de edema y lesión mística como consecuencia de los cambios de permeabilidad inducidos en las células endoteliales y los consiguientes cambios en el equilibrio iónico.⁴

Leucocidina de Panton-Valentine. Esta toxina es sintetizada por el 2-3% de las cepas y está compuesta por dos unidades proteicas sintetizadas por separado, que actúan en forma sinérgica sobre las membranas de las células fagocíticas. Induce la desgranulación de los leucocitos de mediadores de la inflamación.⁴

Toxinas exfoliativas. La prevalencia de cepas productoras de estas toxinas varía geográficamente, pero en general es inferior al 5-10%. Se han identificado dos formas distintas (A y B), y ambas pueden producir el síndrome de la piel escalada. La toxina exfoliativa A es termoestable y de codificación cromosómica, mientras que la B es termolábil y de codificación plasmídica. Actúan destruyendo los desmosomas del estrato granuloso de la epidermis, sin citólisis ni inflamación, por lo que en la capa de la epidermis afectada no se encuentran ni leucocitos ni estafilococos.¹⁸

Enterotoxinas. Se han identificado 8 tipos de enterotóxicas estafilocócicas (A-E; G-I). Son termoestables y resistentes a las enzimas digestivas, son eméticas y causan gastroenteritis.

Toxina del síndrome del shock tóxico (TSST-1). La TSST-1, anteriormente denominada exotoxina pirógena C o enterotóxina F, es una proteína termoestable sintetizada por genes cromosómicos, que actúan como superantígeno. Induce la liberación de citocinas por macrófagos y linfocitos T. En bajas concentraciones produce la extravasación de las células endoteliales, y en altas concentraciones tiene efecto citotóxico¹⁸.

Las infecciones causadas por *S. aureus* son de forma característica, supurativas con tendencia a la formación de abscesos. Muchas de estas infecciones, aunque inicialmente

localizadas, pueden (según el tipo de infección y las características del paciente) ser el origen de bacteriemia.

Staphylococcus aureus es una de las principales causas de infección de herida quirúrgica, tanto superficial como profunda. Asimismo, puede causar infección de úlceras crónicas (úlceras por presión, pie diabético). En todos los casos puede haber signos inflamatorios alrededor de la herida y exudación purulenta.¹⁵

Las infecciones estafilocócicas localizadas de la piel pueden invadir los tejidos blandos contiguos y causar afectación del tejido celular subcutáneo (celulitis) con linfangitis o sin ella, y de la fascia (fascitis). El impétigo es una infección superficial de la piel que afecta con mayor frecuencia a niños en áreas expuestas. Comienza con la aparición de vesículos de contenido blanquecino sobre una base eritematosa que al romperse producen una costra amarillenta.⁶

1.11.2. Infecciones por *Pseudomonas*.

Los microorganismos del género *Pseudomonas* son bacilos gramnegativos aerobios estrictos, no formadores de esporas, móviles (poseen uno o más flagelos polares). Algunas especies pueden utilizar los nitritos o la arginina como último aceptor de electrones, lo que les permite crecer en condiciones anaerobias. La mayoría de las especies poseen oxidasa y catalasa, oxidan la glucosa y tienen una gran capacidad para utilizar fuentes de carbono muy diversas. Los estudios iniciales de homología de rRNA permitieron clasificar el género *Pseudomonas* en 5 grupos. Con posterioridad se demostró la conveniencia de agrupar muchas de las especies incluidas en algunas de esos grupos en otros géneros. En la actualidad en el género *Pseudomonas* se incluye un amplio número de especies que se vienen clasificando en dos categorías: a) grupo de especies fluorescentes: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. monteilii*, *P. putida* y *P. veronii*, y b) grupo de especies no fluorescentes: *P. alcaligenes*, *P. luteola*, *P. mendocina*, *P. oryzae*, *P. pseudoalcaligenes* y *P. stutzeri*.¹⁶

Pseudomonas aeruginosa tiene un flagelo polar. Muchas cepas producen pigmentos fluorescentes que se difunden al medio y pigmentos solubles que, al combinarse, dan una coloración característica en los medios de cultivo, la combinación de pioverdina (pigmento amarillo-verdoso fluorescente) y piocianina (pigmento azul hidrosoluble) produce el típico color verdoso observado en muchas cepas. Algunas otras cepas producen piorrubrina (pigmento

rojo) o piomelanina (pigmento marrón o marrón-negruzco). Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. Oxida la glucosa y la xilosa¹⁸.

Ps. aeruginosa posee una compleja membrana externa en la que se integran una porina principal (OprF) y muchas otras proteínas que, presumiblemente, también actúan como poro; de ellas la de mayor relevancia es OprD, específica para aminoácidos dibásicos y glutamato. Esta estructura limita enormemente el paso de nutrientes (y de otros compuestos, como antimicrobianos) al interior del microorganismo⁴.

Pseudomonas aeruginosa no suele causar enfermedad en personas previamente sanas. Los principales factores del hospedador relacionados con la infección por este patógeno incluyen la pérdida de la barrera mucocutánea, las alteraciones inmunológicas y enfermedades de diversos orígenes.⁴

Pseudomonas aeruginosa puede adherirse tanto a células epiteliales como a superficies inertes. La adherencia celular está mediada por fimbrias y pilli o, en las cepas mucoides, por un exopolisacárido constituido por alginato (a base de ácido manurónico y gulurónico). Este polisacárido es fundamental para la organización de biocapas bacterianas, donde el microorganismo queda protegido de la acción de polimorfonucleares, anticuerpos y antimicrobianos. Produce varias exotoxinas. La elastasa y la proteasa alcalina son enzimas proteolíticas necrosantes, que inactivan inmunoglobulinas, componentes del complemento y citocinas. Es posible que estas enzimas permitan al microorganismo hacerse con nutrientes tras la degradar los tejidos invadidos. El pigmento piocianina también ejerce una acción tóxica frente a las células del epitelio respiratorio⁴.

1.12. PRUEBAS DE LÍMITES MICROBIANOS EN PRODUCTOS FARMACEUTICOS

Este capítulo proporciona pruebas utilizadas para estimar el número de microorganismos aerobios viables presentes y para determinar la ausencia de especies microbianas designadas en artículos farmacéuticos de todo tipo, desde materias primas hasta productos finales. Durante la preparación y realización de las pruebas, deben tomarse las precauciones asépticas necesarias para la manipulación de las muestras. El término

“crecimiento” se usa para designar la presencia y supuesta proliferación de microorganismos viables.

El análisis comienza realizando pruebas preparatorias, donde se pueda demostrar de manera adecuada que las muestras a las que se aplican no inhiban por sí solas, la multiplicación, bajo las condiciones de la prueba los microorganismos que pudieran estar presentes. En consecuencia, antes de realizar una prueba de manera periódica y según circunstancias lo exijan posteriormente, las muestras diluidas del material que se desea analizar se deben inocular con cultivos viables de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Salmonella* separados. Si el o los microorganismos no crecen en el medio utilizado, queda invalidada la parte del análisis y debe modificarse el procedimiento:

1. Mediante un aumento en el volumen de diluyente, manteniendo la misma cantidad de material de prueba.
2. Mediante la incorporación de cantidad suficiente de agentes inactivantes adecuados en los diluyentes.
3. Mediante una combinación apropiada de las modificaciones en (1) y (2) para permitir el crecimiento del inóculo.

Los siguiente son ejemplos de ingredientes que pueden agregarse al medio de cultivo, y de las concentraciones respectivas para neutralizar las sustancias inhibitorias presentes en la muestra: lecitina de soja, 0-5% y polisorbato 20,4.0%.²⁰

PRUEBAS DE RECUENTO MICROBIANO: Estas permitirán el recuento cuantitativo de bacterias mesófilas y hongos que pueden desarrollarse en condiciones aeróbicas. Las pruebas han sido diseñadas principalmente para determinar si una sustancia o preparación cumple con una especificación establecida de calidad microbiológica.²⁰

Esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes debido a que la variedad de especies y tipos diferenciales por las necesidades nutricionales, temperatura, oxígeno, etc., hacen que el número de colonias contadas constituye una estimación de la cifra realmente presente, cuando la técnica es seguida fielmente puede llegar a proporcionar resultados lo suficientemente reproducibles es para dar significado a la prueba.

Cuando la temperatura de incubación ha sido entre los 20 y 37°C se les designa como bacteria mesofilicas aerobias, en este grupo se encuentran bacilos y cocos gram(-) y gram(+).

La técnica puede ser conocida también como cuenta total viable, cuenta estándar en placa viable general, cuenta de mesófilos o cuenta total aeróbica.

En microbiología sanitaria se ha recomendado la utilización de bacterias mesofílicas aerobias que son generalmente:

1. Indicador de la presencia de microorganismos patógenos.
2. Indicador de las condiciones higiénicas en que ha sido manejado el producto.
3. Seguimiento de la eficacia de un proceso germicida o de preservación.
4. Para predecir la vida de anaquel.

Una vez preparada la muestra, se toma con una pipeta estéril 1 ml y se agrega en cajas petri estériles; posteriormente se adiciona 20 ml de Agar Soya Trypticaseína y Agar Dextrosa Papa, homogeneizar las cajas y se dejan a temperatura ambiente para que solidifiquen. Ya solidificadas, introducirlas en la estufa e incubar a 20°C durante 5 días y 37°C en 24 horas, terminado el tiempo de incubación contar las colonias y determinar las UFC/g en la muestra.

PRUEBA DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS: Las pruebas que se describen en este capítulo permitirán determinar la ausencia, o presencia limitada, de microorganismos específicos que puedan ser detectados en las condiciones descritas.²⁰

1.13. JUSTIFICACIÓN.

La utilización de nuevos productos de uso terapéutico, juega un papel importante en el estándar de salud de la población. Por tal, en este trabajo analizamos dos productos de una empresa Mexicana, como Feblozon crema útil en el tratamiento de úlceras varicosas de difícil cicatrización que además tiene un efecto antiséptico y Dermozon crema con efecto bactericida, oxigenante y coadyuvante en el tratamiento de problemas de la piel (acne, infecciones cutáneas, manchas en la piel, Eczemas, Impétigos), en los cuales se evalúa el análisis microbiano.

Es por ello que el trabajo se enfoca a analizar la calidad de los producto farmacéuticos (Dermozon y Flebozon), para asegurar que están libres de contaminación y aptos para uso humano y así prevenir la infección en estas lesiones. Tomando como referencia los Límites microbianos establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. La presencia de bacterias como *Salmonella sp*, *E. coli*, *S. aureus*, *Ps. aureuginosa*, confirma el rechazo de calidad de los productos.

La publicación y difusión de esta investigación puede servir para realizar estudios posteriores, fundamentando la necesidad de conocer el buen funcionamiento del producto, además de dar amplios criterios al consumidor en la adquisición de dicho producto terapéutico.

1.14. HIPÓTESIS.

Sí existe contaminación bacteriana en los productos de uso terapéutico rebasando las especificaciones bacterianas establecidas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, entonces será indicativo de la falta de control de calidad en los productos.

2. OBJETIVO GENERAL:

Determinación de la población bacteriana en cremas coadyuvantes en el tratamiento de úlceras varicosas de difícil cicatrización (Flebozon) y problemas de la piel (Dermozon) para analizar la Calidad de estos productos, mediante los métodos generales de análisis de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

2.1. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Analizar si los productos cumplen con los Métodos generales de análisis de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

- Determinar la presencia bacteriana, mediante el recuento de microorganismos mesófilos aerobios, hongos filamentosos y levaduras; así como, la investigación de microorganismos objetables en dichos productos.

- Investigación bibliográfica de los principios activos: metabolitos del ozono (hidroperóxidos de ácidos grasos) de estos productos que les proporcionen propiedades antisépticas y/o bactericidas.

3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

3.1 MATERIAL.

Ver anexo 1.

3.2. METODOLOGÍA.

Mientras se manipula la muestra, ésta debe mantenerse a una temperatura de 0 a 4°C, en una tina con hielo, checándola continuamente.

Desinfectar la superficie del contenedor con un algodón estéril impregnado con solución de etanol al 70%. Secar la superficie con gasa estéril. Homogeneizar el producto al tomar la muestra necesaria con una espátula estéril.

3.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:

1. En 3 frascos estériles debidamente etiquetados adicionar 10 g de las muestras respectivamente y agregar 0.5 ml de tween 80 estéril a cada uno de los frascos y homogeneizar la muestra. Posteriormente agregar a cada uno de los frascos 90 ml CLM, otro 90 ml de CST y el último 90 ml de C. Tioglicolato respectivamente y agitar perfectamente.

2. Incubar a 35°C± 2 durante 24 a 48 horas para los frascos con CLM y CST. Para el medio inoculado con C. tioglicolato incubar a 35°C± 2 durante 7 días. Marcar los frascos que se enturbien al agregar la muestra. Confirmar si existe crecimiento a los 2 y 7 días de incubación, haciendo una resiembra en AST, inoculando 1 ml de los cultivos inoculados respectivamente, empleando el método de vaciado en placa (Recuento de microorganismos Mesófilos aerobios).

3.2.2. CUENTA TOTAL DE MESÓFILOS Y DE HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS.

En muestras solubles, la técnica de elección es el método de vaciado en placa, para otro tipo de muestras se utiliza el método Número Más Probable, en nuestro caso la muestra es soluble, por tal razón se utilizó el método vaciado en placa.

Método en placa:

1. Inocular por duplicado, 1.0 mL de cada dilución de producto en cajas de Petri estériles, añadir a cada caja de 15 mL a 20 mL del medio Agar Soya Trypticaseína con una temperatura aproximada de 45°C a 48°C. Para hongos y levaduras Agar Dextrosa y Papa. Con movimientos rotatorios suaves, mezclar la alícuota de la muestra con el medio de cultivo.

2. Permitir que el medio solidifique e incubar las placas en posición invertida entre 30°C y 35°C durante 48h a 72h.

3. Después de la incubación, determinar las UFC de la placa 1 (UFC₁) y de la placa 2 (UFC₂). Calcular el promedio de las UFC, con la siguiente ecuación:

$$UFC = [[(UFC_1 + 0.5)^2 + (UFC_2 + 0.5)^2]/2]-0.5$$

4. Anotar el promedio de colonias por dilución, informar UFC/g del producto, considerando el factor de dilución de la muestra. Si las placas no presentan colonias informar: menos de 10 UFC por gramo o mililitro de producto.

3.2.3. INVESTIGACIÓN DE MICROORGANISMOS OBJETABLES.

En función de la vía de administración del producto, proceder a la investigación de los microorganismos señalados a continuación: *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

➤ **Investigación de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.**

Adicionar 10 ml ó g de la muestra a 90 ml de Caldo Soya Trypticaseína o Caldo Trypticaseína adicionado de Lecitina y Polisorbato 20. Mezclar e incubar. Si se observa crecimiento, tomar una asada del cultivo anterior y sembrar por estria cruzada en alguno de los siguientes medios: Agar Sal Manitol, Agar Baird-Parker o Agar Vogel Jonson para el aislamiento de *Staphylococcus aureus* y el medio agar cetrimida para el aislamiento de *Pseudomonas sp.* Si no se observa crecimiento comparar la morfología colonial y la microscópica con la Tabla 1 y Tabla 2.

Medios de cultivo	Morfología Colonial	Morfología Microscopica y Reacción al Gram
Agar Vogel Johnson	Colonias negras rodeadas de zona amarilla	Cocos Gram positivos agrupados en racimos.
Agar Sal Manitol	Colonias amarillas doradas rodeadas de una zona amarilla	Cocos Gram positivos agrupados en racimos.
Agar Baird Parker	Colonias negras lustrosas brillantes rodeadas de zonas claras de 2 mm a 5 mm	Cocos Gram positivos agrupados en racimos.

TABLA 1 Características morfológicas y bioquímicas de *Staphylococcus aureus* sobre medios selectivos diferenciales

Medios de cultivo	Morfología Colonial	Fluorescencia con luz UV	Prueba de oxidasa	Tinción de Gram
Agar cetrimida	Colonias verdosas	verdosas	positiva	Bacilos Gram negativos
Agar Pseudomonas para detección de fluoresceína	Colonias incoloras o amarillas claro	Amarillo claro	positiva	Bacilos Gram negativos
Agar Pseudomonas para detección de piocianina	Colonias generalmente amarillo claro	Azul	positiva	Bacilos Gram negativos

TABLA 2. Características morfológicas y bioquímicas de *Pseudomonas aeruginosa* sobre medios selectivos diferenciales

Si la morfología colonial, la microscópica y las características bioquímicas no corresponden con la descrita en las Tablas 1 y 2, se concluye que la muestra cumple los requisitos de ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Si las características son similares, realizar las siguientes pruebas:

- Confirmación de *Staphylococcus aureus*

Prueba de Coagulasa. Transferir una porción de la colonia sospechosa a Caldo Soya Trypticaseína e incubar 24h. Colocar 0.1 ml del cultivo en un tubo conteniendo 0.5ml de plasma fresco de conejo o de caballo. Incuba en baño de agua a 37°C y observar a las 3h y subsecuentemente por un periodo no mayor de 24h. Si durante este intervalo no se observa ningún grado de coagulación, la muestra cumple los requisitos de ausencia de *Staphylococcus aureus*. Para efectuar la prueba de la coagulasa es necesario emplear control positivo y negativo. Inocular en la misma forma cepas de:

Control positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

Control negativo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Si es necesario, confirmar la presencia de *S. aureus* con pruebas bioquímicas.

- Confirmación de *Pseudomonas aeruginosa*

Producción de pigmentos. Las colonias sospechosas de *Pseudomonas aeruginosa* sembrarlas en los medios Agar Pseudomonas para detección de fluoresceína y Agar Pseudomonas para detección de piocianina incubar a 35°C+/-2 durante 3 días. Observar las colonias a simple vista y con luz ultravioleta y compararlas con la morfología colonial de la tabla correspondiente con la obtenida en los medios indicados, efectuar la prueba de oxidasa.

Prueba de oxidasa. Impregnar una tira de papel filtro con una solución de diclorohidrato de N-N-dimetil p-fenilendiamina al 1% y colocar sobre ella una pequeña porción de la colonia sospechosa. La prueba es positiva si se desarrolla un color púrpura en 10 segundos. Emplear:

Control positivo. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619

Control negativo *Escherichia coli* ATCC 10536.

<Si es necesario, confirmar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* con pruebas bioquímicas.

3.2.4. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE PRESERVACIÓN.

1. Preparar al 0.5 de MacFarland los siguientes microorganismos con cepas recientes:

Candida albicans (ATCC 10231)

Staphylococcus aureus (ATCC 6538)

Escherichia coli (ATCC 11105, 10536)

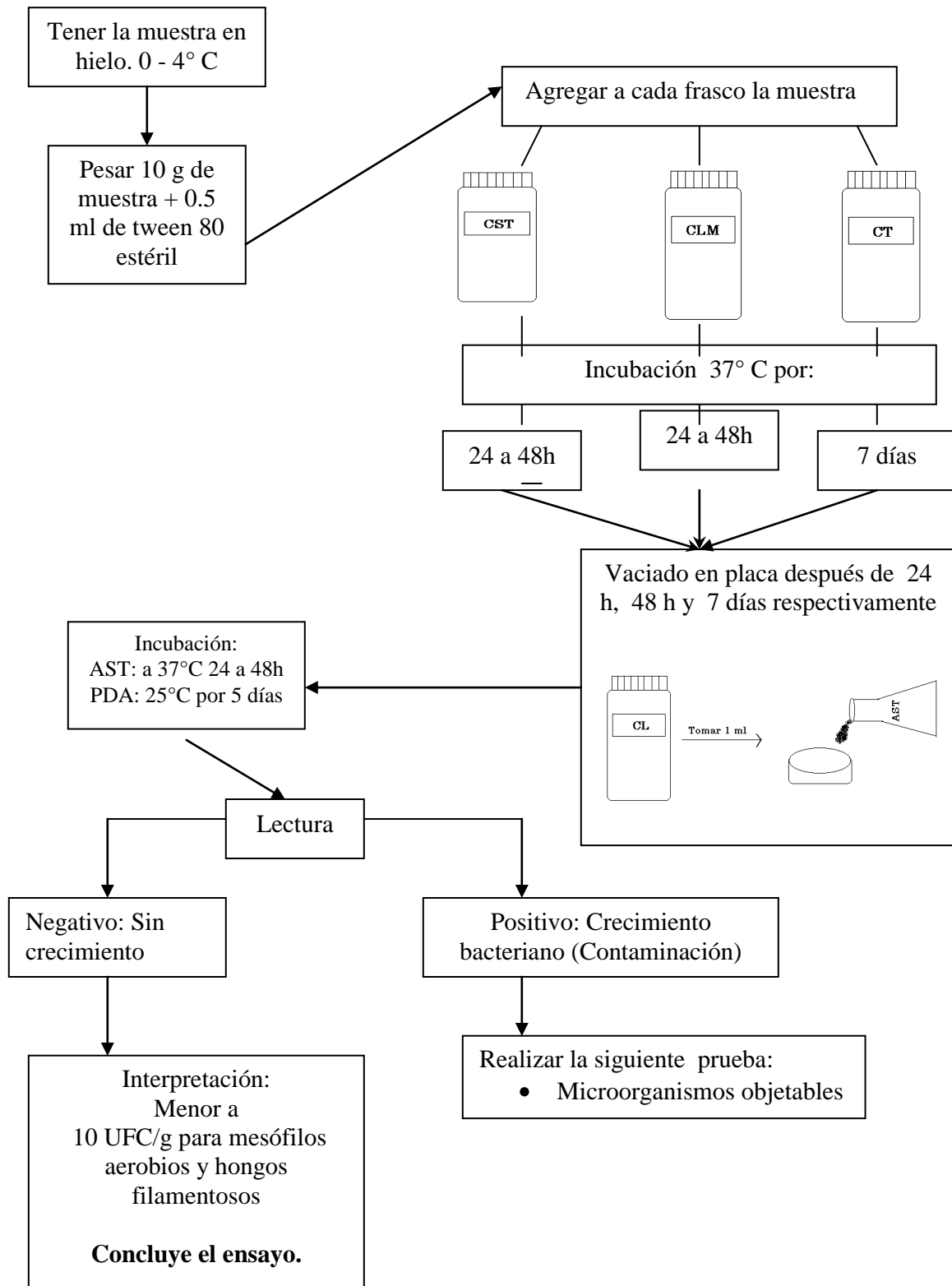
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 15442, 25619)

Salmonella typhimurium caso clínico

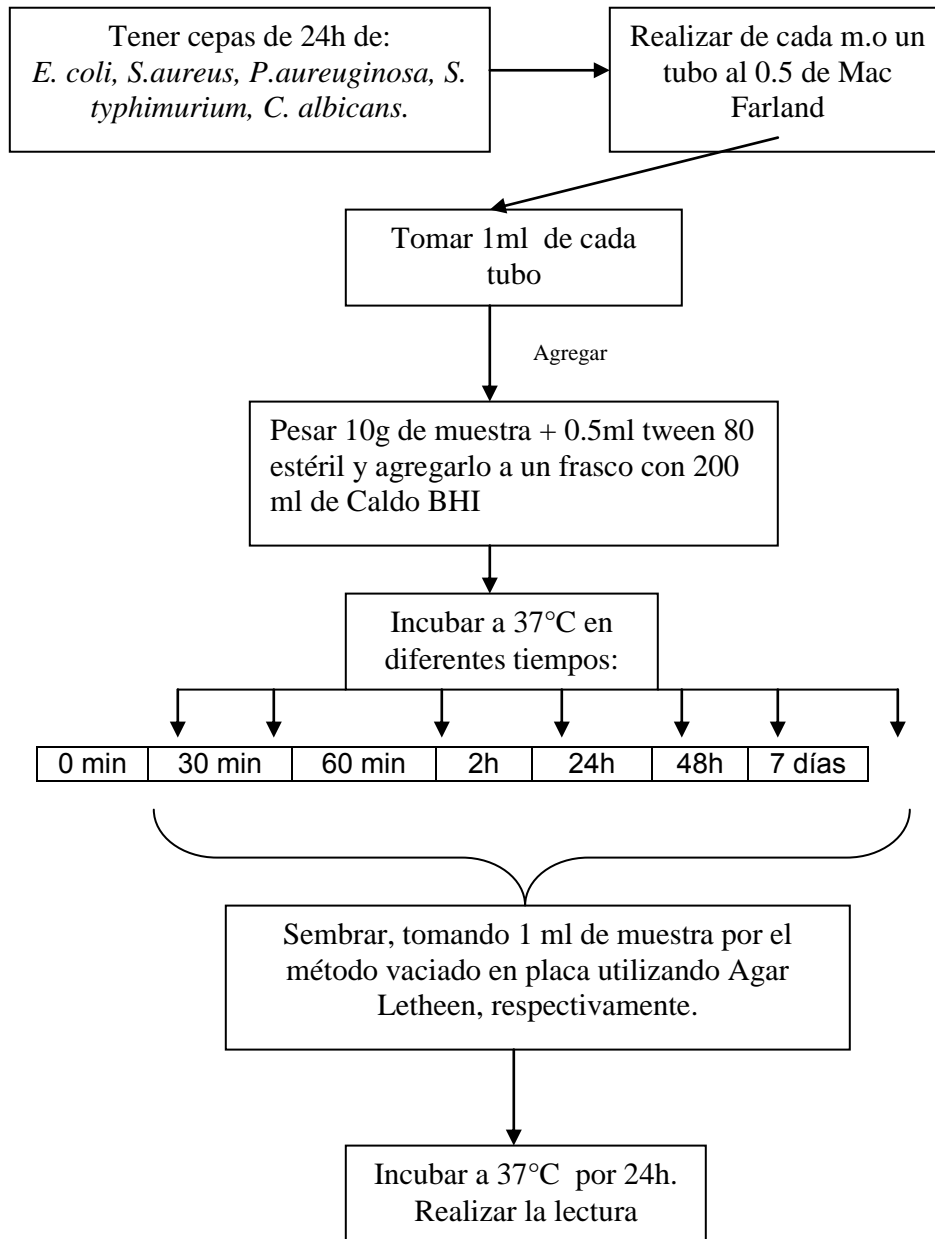
2. Tomar de cada microorganismo al 0.5 de Mac Farland 1ml de muestra y preparar un Pool con todas las bacterias en un tubo estéril.
3. Preparar en un matraz 200 ml de Caldo BHI, adicionar a este, 100 gr de la muestra y 1ml del Pool preparado.
4. Realizar por medio de la técnica de vaciado en placa un sembrado de la muestra preparada con Agar Letheen, en diferentes tiempos: 0 horas, 30 min, 60 min, 2 horas, 24 horas, 48 horas y 7 días con una incubación a 37°C.

3.2.5. DIAGRAMA: EVALUACIÓN DE CREMAS (PROCEDIMIENTO).

EVALUACIÓN DE CREMAS: Preparación de la muestra.



3.2.6. DIAGRAMA: EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE PRESERVACIÓN.



4. RESULTADOS.

EVALUACIÓN DE CREMAS:

4.1. RECuento DE MICROORGANISMOS MESÓFILOS AEROBIOS.

De acuerdo con la prueba se reportaron resultados favorables para la calidad de las muestras analizadas como se observa en la Tabla 3. En la prueba se utilizaron 3 medios de cultivo diferentes que nos ayudan a evaluar la calidad microbiana de las cremas, estos son: Caldo Tioglicolato (CT), Caldo Soya Trypticaseína (CST) y Caldo Lethen Modificado (CLM). El primero es un caldo utilizado para la prueba de esterilidad de productos farmacéuticos que debido a la actividad del grupo sulfhídrico nulifica la posible toxicidad de compuestos mercuriales y otros metales pesados presentes en los productos farmacéuticos; esto facilita el desarrollo de las bacterias presentes en los productos farmacéuticos, el segundo medio utilizado CST, para favorecer en general el desarrollo de los microorganismos, por último el CLM medio altamente nutritivo con agentes neutralizantes para compuestos amonio cuaternario y útil en pruebas desinfectantes.

Tabla 3. Recuento de mesófilos aerobios.

MUESTRA	DERMOZON			FLEBOZON		
	CT	CST	CLM	CT	CST	CLM
Crecimiento a las 24 h	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C
Crecimiento a 48 h	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C
Crecimiento a 7 días	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C
Resultado	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Interpretación (UFC/g)	> 10	>10	> 10	> 10	>10	> 10

CT: Caldo Tioglicolato, CST: Caldo Soya Trypticaseína, CLM: Caldo Lethen Modificado, S/C= sin crecimiento.

La tabla 3 muestra que tanto para las dos cremas Dermozon y Flebozon, la esterilidad es satisfactoria, ya que a las 24, 48 horas y 7 días de incubación a 37°C no se observa ningún crecimiento bacteriano, por lo que se concluye en este paso el Control Microbiológico de éstas, y no es necesaria realizar las pruebas antes ya mencionadas, debido a que no existe ningún crecimiento bacteriano.

4.2. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE PRESERVACIÓN.

Para esta prueba, primero se realizó la identificación bacteriana de cada cepa utilizada. Se comenzó por la caracterización morfológica colonial que se observa en cada medio de cultivo respectivo para cada microorganismo. Después por pruebas primarias y finalmente por pruebas bioquímicas.

Esta prueba es para demostrar el efecto neutralizante sobre el sistema preservativo contenido en las muestras y un desafío de bacterias respectivas ante las cremas que se evalúan para conocer el tiempo en que éstas comienzan a tener un efecto bactericida, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Evaluación del grado de preservación.

MUESTRA TIEMPO	Flebozon (UFC)	Dermozon (UFC)
0 min.	Incontable	Incontable
30 min.	348	108
60 min.	24	3
2 horas	S/C	S/C
24 horas	S/C	S/C
48 horas	S/C	S/C
7 días	S/C	S/C

UFC: Unidades Formadoras de Colonias, S/C = sin crecimiento.

La tabla 4 muestra que para ambas cremas a los 30 minutos comienza un efecto bactericida, Dermozon con un efecto poco mayor que Flebozon, ambas cremas a las 2 horas han inhibido totalmente el crecimiento bacteriano.

4.3. EVALUACIÓN DE CREMAS A LOS 7 MESES.

Estas cremas se volvieron a evaluar con las mismas pruebas el recuento de mesofilos aerobios y preservación a los 7 meses con el objetivo de dar a conocer si siguen teniendo el mismo efecto. Primeramente en la Tabla 5 se muestran los resultados de la prueba de esterilidad la cual sigue siendo satisfactoria, es decir sin crecimiento bacteriano. Para la prueba de preservación se siguió con el mismo procedimiento, en el cual primeramente se realizó la identificación bacteriana de cada cepa utilizada. Comenzando por la caracterización morfológica colonial que se observa en cada medio de cultivo respectivo para cada microorganismo y después por pruebas primarias y finalmente por pruebas bioquímicas.

Tabla 5. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios a los 7 meses.

MUESTRA	DERMOZON			FLEBOZON		
	CT	CST	CLM	CT	CST	CLM
Medio de Cultivo	CT	CST	CLM	CT	CST	CLM
Crecimiento a las 24 h	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C
Crecimiento a 48 h	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C
Crecimiento a 7 días	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C
Resultado	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Interpretación (UFC/g)	> 10	>10	> 10	> 10	>10	> 10

CT: Caldo Tioglicolato, CST: Caldo Soya Trypticaseína, CLM: Caldo Letheen Modificado, S/C= sin crecimiento.

En la Tabla 6 se muestran los resultados, se observa un gran cambio, anteriormente existe un efecto bactericida comenzando a los 30 minutos (Tabla 4), mientras después de 7 meses no se muestra ningún efecto apreciable ni a los 7 días de la evaluación, cabe mencionar que se observa una ligera disminución de crecimiento bacteriano pero que no es contable.

Tabla 6. Evaluación del grado de preservación a los 7 meses.

MUESTRA TIEMPO	Flebozon (UFC)	Dermozon (UFC)
0 min.	Incontable	Incontable
30 min.	Incontable	Incontable
60 min.	Incontable	Incontable
2 horas	Incontable	Incontable
24 horas	Incontable	Incontable
48 horas	Incontable	Incontable
7 días	Incontable	Incontable

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

4.4. EVALUACIÓN DE CREMAS CONTROL.

Se llevaron a cabo paralelamente, las mismas pruebas realizadas con otras dos cremas comerciales diferentes como Vitacilina, crema que ayuda a la cicatrización y que además es bactericida y crema de Pond's utilizada para la suavizar la piel. Estas representan

nuestros controles en nuestro análisis con el objetivo de comparar la calidad microbiana de las cremas evaluadas con cremas que ya están en el mercado. En la Tabla 7 se muestran los resultados de la prueba de esterilidad y la prueba de preservación para ambas cremas.

Tabla 7. Evaluación de la prueba de esterilidad y de preservación en dos cremas comerciales (muestras control)

PRUEBA.	MUESTRA/ TIEMPO	VITACILINA			POND'S		
		CT	CST	CLM	CT	CST	CLM
PRUEBA DE ESTERILIDAD (PRUEBA PREELIMINAR)	Medio de Cultivo						
	Crecimiento a las 24 h	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C
	Crecimiento a 48 h	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C
	Crecimiento a 7 días	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C
	Resultado	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
	Interpretación (UFC/g)	> 10	>10	> 10	> 10	>10	> 10
PRUEBA DE PRESERVACIÓN	TIEMPO	UFC			UFC		
	0 min.	Incontable			Incontable		
	30 min.	Incontable			Incontable		
	60 min.	390			Incontable		
	2 horas	S/C			Incontable		
	24 horas	S/C			Incontable		
	48 horas	S/C			Incontable		
	7 días	S/C			Incontable		

CT: Caldo Tioglicolato, CST: Caldo Soya Trypticaseína, CLM: Caldo Lethen Modificado, S/C= sin crecimiento, UFC: Unidades Formadoras de Colonias. S/C: sin crecimiento.

La tabla 7 muestra que ambas cremas se encuentran libres de microorganismos ante la prueba de mesofilos aerobios, mientras que para la prueba de preservación la muestra de vitacilina comienza a los 30 minutos a tener un efecto, terminando esté a sólo 60 minutos. Para la muestra de Pond's no muestra este efecto, ya que esta crema no tiene una propiedad bactericida.

5. DISCUSIÓN.

Las disposiciones de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) establecen los métodos para la determinación del contenido microbiano en productos farmacéuticos, para asegurar que están libres de contaminantes y son aptos para uso humano, de acuerdo con lo establecido por la Ley General de Salud, su reglamento y demás disposiciones aplicables de la Secretaría de Salud. Estas disposiciones siguen un conjunto de pruebas que indican los límites microbianos, cuyo objetivo es evaluar la calidad sanitaria de productos farmacéuticos, mediante el recuento de microorganismos Mesófilos aerobios, hongos filamentosos y levaduras; así como la investigación de microorganismos objetables. Tomando como base la literatura, de acuerdo a nuestros resultados, en las Tablas 3, 5 y 7 se reportan los Límites Microbianos encontrados, se observa que ambas cremas no presentan una contaminación en la cuenta viable de aerobios dando un crecimiento menor a 10 UFC/g de muestra a las 24h, 48h y 7 días y por tanto no existe presencia de microorganismos objetables. Es evidente que si no existe crecimiento bacteriano en los medios inoculados de Caldo Soya Trypticaseína, Caldo Tioglicolato y Caldo Letheen Modificado a las condiciones necesarias, no tendremos crecimiento en las demás pruebas y poder aislar microorganismos objetables, hongos y levaduras en dichos productos. Por lo que concluye el ensayo, y las cremas Dermozon y Flebozon se encuentran libres de microorganismos que afecten o perjudiquen la salud humana. Por otro lado se analiza la prueba preliminar (prueba de preservación), requerida por la FEUM, necesaria para demostrar que bajo las condiciones de prueba, es posible recuperar a los microorganismos control previamente inoculados en la muestra, prueba que ayuda a neutralizar o eliminar la actividad antimicrobiana que puedan tener los conservadores del producto. En la evaluación, se utilizaron cepas bacterianas previamente identificadas por pruebas primarias y secundarias. También nos podría indicar, por una parte el desafío de un pool de bacterias (*C. albicans* ATCC 10231, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 10536, *Ps. aeruginosa* ATCC 15442, y *S. typhimurium*, identificadas e igualadas a la concentración del 0.5 de Mc Farland respectivamente), ante las cremas Dermozon y Flebozon, que se evalúan para conocer el tiempo aproximado en que éstas comienzan a inhibir crecimiento bacteriano, de acuerdo a sus principios activos, éstas tienen propiedades bactericida y antiséptica respectivamente. Al analizar la Tabla 4, podemos observar que existe un efecto bactericida en ambas cremas a partir de los 30 min, ya que el crecimiento bacteriano al tiempo cero es incontable y a los 30 min comienza una disminución notable de bacterias y a las 2 horas el crecimiento es nulo, por lo que se muestra el efecto

bactericida. Sin embargo, al evaluar las cremas después de 7 meses, Tabla 6 de resultados, se observa que ya no existe un efecto bactericida, realizando la misma prueba, no hay inhibición de bacterias a ninguno de los diferentes tiempos manejados. Es decir, que las cremas Dermozon y Flebozon pierden su capacidad bactericida en cierto tiempo determinado, antes de 7 meses. Esta información es importante, de acuerdo con la caducidad de las cremas, pues esto refleja que los principios activos pierden su actividad, y por lo tanto, tienen un corto tiempo de ser viables a la temperatura recomendada. Cabe mencionar que no se realizaron otras pruebas para conocer el efecto antibacterial de estas cremas ya que es necesario realizarlo con los compuestos activos de estas; es decir el aceite de coco y 20 mg de hiperoxidos de ácidos grasos.

En este estudio se muestra el análisis microbiológico de Flebozon y Dermozon cremas que contienen un principio activo con efecto bactericida; los metabolitos del ozono, uno de los descubrimientos más notables durante los últimos años en el campo de la medicina alternativa. El empleo del ozono como agente terapéutico y su investigación, es uno de los objetivos de este trabajo. No obstante, a pesar de la práctica cada vez más extendida de la ozonoterapia en el mundo, existen todavía aspectos contradictorios alrededor de su aceptación como técnica terapéutica. Pues, a pesar de la escasa producción científica sobre las aplicaciones terapéuticas del ozono recogida, se observó un crecimiento exponencial de esta durante la última década, así como una amplia gama de patologías que registraron sus efectos positivos. Ello confirmó la existencia de una evidencia científicamente válida que acredita su uso como técnica terapéutica en la práctica clínica. Al ser el ozono un gas extremadamente reactivo, se postula que sus principales mecanismos de acción se relacionan con la generación de productos secundarios, al reaccionar de forma selectiva con los dobles enlaces carbono-carbono de los componentes orgánicos, principalmente ácidos grasos poliinsaturados presentes en el plasma y en las membranas celulares. A partir de la reacción del ozono con dichos compuestos se generan los llamados ozónidos y los peróxidos orgánicos los que en cantidades adecuadas y controladas ejercen diferentes acciones biológicas que le confieren una serie de propiedades terapéuticas²¹. El uso del ozono ha resultado ser un tema controvertido ya que por un lado se reconoce en diversas publicaciones que es un importante contaminante ambiental, con potente poder oxidante y capacidad de producir efectos adversos para la salud, tal como se ha referido, cuando se pone en contacto con la vías aéreas tanto de animales como de humanos, causando inflamación en los tejidos pulmonares con posterior fibrosis¹. Unido a ello y en base a sus propiedades se ha demostrado de forma convincente que utilizando la vía adecuada para su administración y mediante dosis controlada es capaz

de producir efectos beneficios en múltiples enfermedades sin reacciones adversas, e incluso hay trabajos que reportan ausencia de toxicidad del ozono empleado bajo dichas condiciones. En general se acepta que el ozono puede constituir un procedimiento terapéutico que estimula los mecanismos defensivos naturales del organismo con los consiguientes beneficios para su estado de salud, siempre que se emplee por la vía y en dosis adecuadas.

Se han desarrollado hasta el momento diferentes investigaciones relacionadas con las reacciones biológicas del ozono y a partir de estas con sus propiedades terapéuticas. Las propiedades germicidas de este gas han sido reconocidas desde los inicios de las investigaciones sobre el mismo y han conllevado al empleo para la desinfección del agua, aplicación que se ha extendido en los últimos años en diversos países. De manera específica se ha demostrado que el ozono es capaz de inactivar diferentes tipos de gérmenes tales como, virus, bacterias, tanto gram positivas como gram negativas y hongos. Se ha reportado en investigaciones que el ozono daña ácido nucleídeo bacterial. El análisis estructural de tRNA muestra que ocurre una degradación preferente de residuos de guanina. El ozono fracciona proteínas en residuos de aminoácidos, triptófano, no obstante la reacción con lípidos ocurre en un doble enlace carbono-carbono presente en ácidos grasos insaturados produciendo diferentes productos tóxicos tal como peróxidos de hidrogeno, hidroperóxidos, aldehídos y ozónidos²¹. Existen investigaciones del estudio de agentes antimicrobianos como aceites esenciales ozonizado, el más reportado es la actividad del aceite de girasol (Oleozon)²¹, ha mostrado una importante actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomona* y *Escherichia coli*, además de *Mycobacteria*, la cual reporto ser más susceptible que las otras bacterias. Oleozon reporta actividad antimicrobiana contra todo lo analizado, con un rango de MIC entre 1.18 a 9.5 mg/ml, determinada por el método de dilución en agar y para *Micobacteria* utilizaron la prueba de proporción de microgota en agar sobre medio sólido. Cabe mencionar que se ha reportado el exitoso tratamiento en pacientes afectados por infecciones bacteriales y fúngicas, con aplicación tópica diaria con Oleozon²². Por lo que es ejemplo clave en la investigación, la gran disponibilidad del aceite de girasol que hace a Oleozon un competitivo agente antimicrobiano, que a comparación de flebozon y dermozon aun falta una investigación concreta que los respalde.

6. CONCLUSIONES.

- ④ Se evaluaron los límites microbianos de Flebozon y Dermozon, se demostró la ausencia de microorganismos patógenos en los productos, para mesófilos aerobios, hongos filamentosos y levaduras menor a 10 UFC por gramo. Se determinó la prueba de preservación, la cual se basa en su capacidad para poner en evidencia los microorganismos presentes en las cremas; utilizando agentes neutralizantes de conservadores, que a pesar de la incorporación los microorganismos control no se recuperaron a un tiempo de dos horas, por lo que se asumió actividad bactericida del producto.
- ④ Es importante mencionar que al analizar una experimentación, debe ser repetible al menos tres veces, en este caso solo se realizó una vez debido que la empresa no proporcionó la cantidad de muestra necesaria. Por esta razón esta investigación queda abierta para reunir mayor evidencia. Sin embargo a pesar de la nebulosa que aún se cierne sobre las bases teóricas que explican los mecanismos de acción del ozono como agente terapéutico y de la escasa producción científica sobre sus aplicaciones terapéuticas, recogida en este trabajo, se observó un crecimiento, así como un grupo mayor de patologías donde se emplearon sus efectos beneficiosos. Ello confirma la existencia de una evidencia científicamente válida que acredita su uso como técnica terapéutica en la práctica clínica.
- ④ Las cremas Flebozon y Dermozon de acuerdo a la investigación teórica recogida en este trabajo tienen propiedades bactericidas pues se ha reportado en artículos, que el ozono daña al ácido nucleico bacteriano y en un análisis estructural de tRNA mostraron que ocurre una degradación preferente de residuos de guanina. El ozono fracciona proteínas en residuos de aminoácidos y triptófano, no obstante la reacción con lípidos ocurre en un doble enlace carbono-carbono presente en ácidos grasos insaturados produciendo diferentes productos tóxicos tal como peróxidos de hidrógeno, hidroperóxidos, aldehídos y ozónidos.
- ④ Otra conclusión es que los metabolitos del ozono pueden ser una alternativa en la medicina que se está realizando evidencia científica que la acredite. Hasta ahora como bactericida se ha reportado que no produce resistencia bacteriana, ventaja en comparación con los antibióticos.

REFERENCIAS.

1. ARENCIBIA R., Leyva Y., et al. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA SOBRE APLICACIONES TERAPÉUTICAS DEL OZONO EN EL WEB OF SCIENCE.
2. GONZÁLEZ Chamorro R., Heliodoro P., et al. DETERMINACIÓN DE OZONO EN ÁREA DE OZONOTERAPIA Y FUENTE GENERADORA. Rev. Cubana Salud Trabajo 2003; 4(1-2)
3. SALDIVAR J. Dr. TERAPIA DE OZONO PARA TRATAMIENTO DE AFTAS RECIDIVANTES . Copyright © 2008. V. All Rights Reserve. Reproduction or republication strictly prohibited without prior written permission.
4. LENNETTE Edwin H., Spaulding Truant. MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 2ed., Washington D.C., American Society for Microbiology. 1975. pp 91-95, 256-258.
5. <http://www.farmaciaprana.com.ar/shop/detallenot.asp>
6. STEPHEN J. Mc Phee, William F. Ganong, et. al. FISIOPATOLOGÍA MÉDICA: Una introducción a la medicina clínica. 3ª ed. México D.F. Ed. El manual moderno. 2001. pp. 59-60, 191-193, 320-322.
7. VIGNA I., Menéndez-Cepero S. APLICACIÓN DE LA OZONOTERAPIA EN DIFERENTES ENFERMEDADES OFTALMOLÓGICAS: ESTUDIO DE 59 CASOS. RECVET: 2007, Vol. II, N° 11.
8. CAMPOS Ramírez A., Calles Fernández B., et al. LA OZONOTERAPIA, UNA NUEVA OPCIÓN DE TRATAMIENTO EN LA MEDICINA VETERINARIA. Universidad de Granma. Centro de Investigaciones del Ozono. Hospital Provincial de Guantánamo.
9. <http://www.solociencia.com/biologia/microbiologia-tecnicas.htm>
10. <http://www.ozonoterapiatenerife.com/efecto.htm>
11. BARROETABEÑA, R., Sánchez, A., et al. Acción del aceite ozonizado sobre el proceso inflamatorio en heridas de piel de animales de experimentación. Facultad de Ciencias Médicas "Mariana Grajales Coello" Holguín. Correo Científico Médico de Holguín 2002;6(2)
12. MELÉNDEZ S., Fernández M., Amoroto M., et. al. EFICACIA Y SEGURIDAD DEL OLEOZON® TÓPICO EN EL TRATAMIENTO DE PACIENTES CON IMPÉTIGO. Rev Panam Infectol: 2007; 9(2):23-29
13. <http://www.genecellmexico.com.mx>
14. HERNANDEZ Valdepeña Israel. DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN SISTEMA COSMETICO A BASE DE FOSFOLÍPIDOS. 1997. FESC. pp 10-13.

15. TAY Zavala Jorge. MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA MÉDICA. 3ed. México. Méndez Editores. 2003. pp 70-74, 105-107.
16. AUSINA Ruiz Vicente, Moreno Guillén S. TRATADO SEIMC DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGIA CLÍNICA. Madrid España, 2006, Ed. medica panamericana. 2006. pp 225-226, 247, 253-257, 347-351, 1355-1356.
17. <http://www.saludymedicinas.com.mx/nota.asp>
18. http://www.fundapreve.org.ar/ulcera_varicosa.htm
19. PRESCOTT Lansing M. Harley J., et al. MICROBIOLOGÍA. 4ed. Madrid, España. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. 2000. pp 419-431, 613.
20. SECRETARIA DE SALUD. Comisión Permanente Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). 8ª ed. México. Vol 1. 2004. pp 489-496.
21. L.A. Sechi, I. Lezcano, et.al. (2001) Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone), *Journal of Applied Microbiology*. 90, 279-284.
22. FALCON Lincheta, L. Menendez Cepero, et.al.. (1998) Aceite ozonizado en Dermatología. Experiencia de 9 años. *Revista CENIC Ciencias Biologicas* 29, 192-195.
23. AVILES Robles Maria G., Zamudio Castellano C. ANALISIS BACTERIOLOGICO DE AGUA EMBOTELLADA COMERCIAL. 1996. FESC.
24. DIAZ BRUNO Amalia, Cruz de la Concha M. Marcela. DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA EN PRODUCTOS FITOFARMACEUTICOS. 2000. pp 15-19, 29-39.
25. NORMA Oficial Mexicana NOM-089-SSA1-1994, Bienes y servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza.
26. <http://www.varices.com.ve/seccion.asp>
27. ALVAREZ, M. and O'Brien, R.T. (1982) Mechanisms of inactivation of poliovirus by chlorine dioxide and iodeine. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 1064-1071.
28. ARANA, I., Santorum, P., et al.(1999) Chlorination and ozonation of waste-water: comparative analysis of efficacy through the effect on *Escherichia coli* membranes. *Journal of Applied Microbiology* 86, 883-888.
29. CAMPOS Ramírez R. TRATAMIENTO CON OLEOZÓN. UTILIZACIÓN TÓPICA DEL OLEOZÓN COMO ALTERNATIVA DE TRATAMIENTO EN ALTERACIONES CUTÁNEAS CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS COMPATIBLES A LA DERMATOMICOSIS BOVINA.

30. DAUTREC C.V. Biologo, a quien le fue concedido por los servicios prestados a la Salud Pública, La Cruz de Caballero de la Orden de Mérito de la Investigación y la Invención, señala: " LA OZONOTERAPIA PARECE TENER POSIBILIDADES ILIMITADAS, PERO SE LE ASFIXIA PORQUE CURA SIN MEDICAMENTOS "
31. DORMAN H.J.D. and Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308-316.
32. LEZCANO, I., Nunez, et al. (1998) Actividad in vitro del aceite de girasol ozonizado (Oleozone) frente a diferentes especies bacterianas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 28, 35.
33. PRYOR, W.A. and Uppu, R.M. (1993) A kinetic model for the competitive reaction of ozone with amino acid residues in proteins in reverse micelles. *Journal of Biological Chemistry* 268, 3120-3126.

ANEXO 1.

MATERIAL Y EQUIPO

Matraces Erlenmeyer 150 ml
Pipetas graduadas de 1, 2, 5 ml
Vasos de precipitado 100, 200 ml
Probetas 1000 ml
Cajas de Petri 20x100mm y 15x100mm
Termómetro de graduación de -10 a 200°C
Estufa a 35 +/- 2°C
Refrigerador
Balanza granataria
Autoclave
Espátula
Asa y porta asa bacteriología

CEPAS DE REFERENCIA

Candida albicans (ATCC 10231)
Staphylococcus aureus (ATCC 6538)
Escherichia coli (ATCC 11105, 10536)
Pseudomona aeruginosa (ATCC 15442, 25619)
Salmonella typhimurium

REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.

Etanol al 70%
Tween 80
Hielo
Solución Amortiguada de fosfatos PBS
Agar Letthen modificado BD DIFCO
Agar Soya Tripticaseina (AST) BD BIOXON
Agar Infusión Cerebro Corazón (A. BHI) BD DIFCO
Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) BD BIOXON
Caldo Letthen modificado (CLM) BD DIFCO
Caldo Soya Tripticaseina (CST) BD BIOXON
Caldo Tioglicolato. BD BIOXON
Tubo de Nefelómetro de 0.5 de Mc Farland