



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**EVALUACIÓN DEL CONTROL DE CALIDAD  
BACTERIANA EN UNA CREMA ANTISÉPTICA  
HECHA A BASE DE ACEITE DE SEMILLA DE UVA  
(OZONOVID)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A  
ERIKA TINOCO OVIEDO**

**ASESORES  
Dra. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA  
Dr. ABEL CIPRIAN CARRASCO  
M.C. NATHALIEL SOTO GUEVARA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## A G R A D E C I M I E N T O S

A mi mamá *Antonia Oviedo*:

Por transmitirme la fe, la confianza, por sus consejos y oraciones las cuales han sido la luz de mi vida que me han hecho sentir que nunca he estado sola y enseñado que nada es imposible.

A mi papa *Efrén Tinoco*:

Por inculcarme el espíritu de lucha alentándome a seguir siempre adelante y dándome lo mejor de sí, hechos que han logrado que alcance una de mis más preciadas metas.

A mis hijos *Erick y Yareni*:

Quienes me han dado la fortaleza para superarme, sobre todo a Erick, por ser el motivo de mi lucha continúa.

A mis hermanas *Elsa y Mary*, sin menospreciar a mis *suegros y cuñadas*:

Por el amor, la confianza y el apoyo que siempre me han brindado.

A mi esposo *Rodolfo Edgar*:

Quien siempre me ha apoyado, acompañándome en momentos buenos y malos, quien siempre me ha brindado amor, consuelo y aliento.

A mis amigas: *Cirenia, Gabriela, Alondra, Claudia, Mónica y Lorena, entre otras:*

Les adeudo la ternura, las palabras de aliento, el abrazo, por compartir los cimientos que forjan el principio de una lucha continua que nos presenta la vida paso a paso.

Al personal de laboratorio de Virología en Posgrado:

Al Sr Gabino Sánchez Galud, gracias por su apoyo técnico en el laboratorio y amistad brindada incondicional.

Pero sobre todo especialmente a la *Dra. Susana E. Mendoza Elvira*, por el apoyo, facilidades y asesoramiento brindado para la realización de éste trabajo.

En conjunto con el M.V.Z. David Trujillo Ceballos, que no por mencionar al último se hace menos, por su apoyo técnico en informática, durante toda la instancia en el área.

Al *Dr. Pascual Portilla Pérez y esposa*, por haberme brindado en el trabajo, comprensión, confianza y facilidades para seguir estudiando a pesar de las adversidades.

**A todos ellos “*muchas gracias*”.**

# I N D I C E

<u>TEMA</u>	<u>PÁGINAS</u>
RESUMEN.....	i
1.0 INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Control de calidad.....	11
1.2 Ozonoterapia.....	14
1.2.1 Toxicidad del ozono .....	17
1.2.1 El ozono como bactericida, fungicida y virucida.....	19
1.3 Características del producto analizado .....	22
1.3.1 Compuesto activo.....	23
1.4 Antisépticos.....	27
1.4.1 Recomendaciones para la utilización de antisépticos.....	28
1.5 Defensas constitutivas del cuerpo.....	30
1.6 Mecanismos de las enfermedades infecciosas.....	31
1.7 Flora patógena en función de la vía de administración del producto.....	31
1.7.1 Infecciones por estafilococos.....	31
1.7.1.1 Patogenia.....	32
1.7.1.2 Componentes de la pared celular.....	32
1.7.1.3 Enzimas.....	34
1.7.1.4 Toxinas.....	35
1.7.1.5 Manifestaciones clínicas.....	36
1.7.1.6 Infecciones de la piel.....	36
1.7.2 Infecciones por <i>Pseudomonas</i> .....	37
1.7.2.1 Patogenia.....	38

1.7.2.2 Componentes de la pared celular.....	39
1.8 JUSTIFICACIÓN.....	40
1.9 HIPÓTESIS.....	40
2.0 OBJETIVO GENERAL.....	41
2.1 Objetivos particulares.....	41
3.0 MATERIAL Y EQUIPO.....	42
4.0 MÉTODOS.....	42
4.1 Toma de muestra (producto).....	42
4.2 Preparación del pool bacteriano.....	42
5.0 PROCEDIMIENTO	
5.1 Prueba de esterilidad.....	43
5.2 Cuenta total de mesófilos (vaciado en placa).....	43
5.3 Cuenta de hongos y levaduras.....	44
5.4 Número más probable (NMP).....	44
5.5 Determinación de <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	45
5.6 Efectividad del preservativo antimicrobiano.....	46
5.6.1 Crema semisólida.....	46
5.6.2 Aceite de semilla de uva.....	47
5.7 Desafío microbiano al aceite de semilla de uva.....	47
6.0 RESULTADOS.....	49
7.0 DISCUSIÓN.....	57
8.0 CONCLUSIÓN.....	64
9.0 REFERENCIAS .....	80

## **Anexos**

### **Anexo A (Tablas)**

Tabla No.1 Disminución de crecimiento bacteriano.....	49
Tabla No. 2 Evaluación de la efectividad del preservativo.....	50
Tabla No. 3 Desafío microbiano al aceite de semilla de uva.....	51
Tabla No. 4 Prueba de esterilidad a los 7 meses.....	53
Tabla No. 5 Evaluación de la efectividad de preservación a los 7 meses.....	54
Tabla No. 6 Prueba de esterilidad a cremas control.....	55
Tabla No. 7 Evaluación de la efectividad de preservación a controles.....	56
Tabla No. 8 Número más probable (NMP).....	66
Tabla No. 9 Características morfológicas y bioquímicas.....	67
Tabla No. 10 Pruebas bioquímicas para diferenciación de bacterias.....	67

### **Anexo B (Material y equipo)**

B.1 Material.....	68
B.2 Equipo.....	68
B.3 Reactivos y medios de cultivo.....	69
B.4 Cepas de referencia.....	69

### **Anexo C (Métodos en diagrama de flujo)**

C-1 Prueba de esterilidad.....	70
C-2 Cuenta total de mesófilos.....	71
C-3 Cuenta de hongos y levaduras.....	72

C-4 Número más probable (NMP).....	73
C-5 Determinación de <i>P. aeruginosa</i> .....	74
C-6 Efectividad de preservación de la crema semisólida.....	75
C-7 Efectividad de preservación del aceite de semilla de uva.....	76
C-8 Desafío microbiano al aceite de semilla de uva.....	77

### Figuras

Figura No. 1 Disminución de crecimiento bacteriano en A. Leethen.....	51
Figura No. 2 Disminución de crecimiento bacteriano en BHI.....	52

<u>Abreviaturas</u> .....	78
---------------------------	----

## RESUMEN

En el presente trabajo, se determinó el contenido microbiano de un producto antiséptico ozono-derivado, hecho a base de semilla de uva (Ozonovid), para evaluar la calidad y asegurar que esté libre de contaminación y no afecte al consumidor; basándose en la NOM-089-SSA 1-194. Esta crema presenta efectos terapéuticos, principalmente como antiséptico, dependiendo del lugar de aplicación y el contenido de metabolitos de ozono.

El análisis microbiológico consistió en evaluar pruebas que indiquen que el producto en estudio debe estar libre de microorganismos objetables como: *S. aureus*, *Pseudonoma aeruginosa*, entre otros la *E. coli*, hongos filamentosos y levaduras (*C. albicans*), así como cuenta total de mesófilos (vaciado en placa), número más probable (NMP), y la efectividad de preservativo antimicrobiano tanto en la crema semisólida como en el aceite de semilla de uva.

La evaluación de la calidad de la crema y el aceite, demostró resultados favorables en su análisis, no encontrando los microorganismos objetables, patógenos, hongos filamentosos y levaduras, por lo que el límite bacteriano fue <10 UFC/mg de muestra. Las pruebas indican que el producto es seguro para su uso, manteniendo una esterilidad confiable a pesar del tiempo; en la prueba de preservación se observó actividad bactericida, notable por su disminución de crecimiento bacteriano a los 60 min de tan solo 3 UFC, la cual se evaluó nuevamente a los 7 meses, sin presentar contaminación alguna, pero con una gran desventaja en cuanto a la finalidad del producto ya que no mantiene su efecto terapéutico del principio activo contenido en la crema.

## **1.0 INTRODUCCIÓN.**

El Ozono fue descubierto en 1840 e inicialmente se empleó como germicida, por su gran poder antiséptico y su amplio espectro de acción; su uso tiene un especial interés, ya que se han llegado a publicar resultados altamente satisfactorios de su utilización en diferentes tratamientos. Para su aplicación en medicina se produce a partir de oxígeno medicinal, mediante generadores especialmente diseñados.

El tratamiento consiste básicamente en la aplicación tópica del producto antiséptico, donde el empleo de la crema es coadyuvante en el tratamiento de: lesiones cutáneas, infecciones bacterianas y micóticas.

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: seguros, eficaces, inocuos y libres de contaminación bacteriana. Por tal razón las pruebas biológicas y microbiológicas son muy diversas, dependiendo del origen de la materia prima, forma farmacéutica, etc. Tomando así los requisitos generales de calidad microbiológica: 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, incubados a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 72 horas. El número de microorganismos no debe ser mayor a lo especificado en metodología.

La determinación de microorganismos patógenos, consiste en inocular sobre medios nutritivos la muestra dispersa en un líquido estéril e inocular por 48 horas. Posteriormente se inoculan 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 u confirmándose con pruebas bioquímicas.

La capacidad de los metabolitos del ozono 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. La existencia de los metabolitos del ozono pueden prepararse en diferentes formas: emulsiones lipofílicas, cremas, óvulos y supositorios; donde presentan actividades biológicas locales y efectos terapéuticos específicos dependiendo del lugar de aplicación y el contenido del metabolito de ozono.

## 1.1 CONTROL DE CALIDAD

Antes de 1965 no se daba importancia a la calidad microbiológica de productos farmacéuticos no estériles, pero surgieron varios problemas de salud en 1966 y 1967 en Estados Unidos de Norte América a consecuencia de la contaminación microbiana en tabletas de tiroxina, fue entonces cuando surgió el interés de determinar el contenido microbiológico en formas farmacéuticas no estériles. Y en 1970 la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (FEUM) por primera vez publicó pruebas para determinar contaminación microbiana en este tipo de productos, así como materias primas, proceso de manufactura y el producto terminado. En la USP XVIII se estipula “Los artículos farmacopéicos deben ser monitoreados por atributos microbianos, haciendo mayor énfasis en materias primas de origen vegetal o animal, especialmente en aquellos que no pueden ser esterilizados durante procesos subsecuentes. Con respecto a México los sistemas de calidad se han ido generando con base a experiencias derivadas en los países de mayor desarrollo e industrializados, originando un cambio en los conceptos de calidad en la industria de bienes y servicios. Desarrollándose la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) donde se especifican las Normas Oficiales de Calidad para los productos farmacéuticos.<sup>(1)</sup>

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. 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.<sup>(1)</sup>

La calidad es un requisito básico de los medicamentos, no sólo por su significación intrínseca, sino porque constituye la base sobre la que reposa la reproducibilidad de los parámetros de seguridad y eficacia.<sup>(2)</sup>

Por esta razón las pruebas biológicas y microbiológicas son muy diversas, dependiendo del origen de la materia prima y su forma farmacéutica, exigiendo cierto grado de especialización y competencia. Estas pruebas se aplican principalmente a una gran variedad de levaduras, hongos y bacterias que pueden ocasionar una serie de problemas como: la descomposición del principio activo, cambios de color, olor, textura, ruptura de la 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 UFC de microorganismos aerobios presentes por gramo o mililitro de muestra, ésta consiste en inocular la muestra a ensayar en placas o tubos conteniendo medio de soya-caseína, se incuban a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 72 hr. El número de microorganismos no debe ser mayor al especificado en la norma oficial para cada producto. Mucho más importante que el número total, son los tipos de microorganismo presentes, sobre todo los que deterioran el producto o son nocivos para la salud. <sup>(3)</sup>

La determinación de microorganismos patógenos, consiste en inocular sobre medios nutritivos la muestra dispersa en un líquido estéril por 48 hr. Posteriormente se inocula sobre medios selectivos útiles para la identificación preliminar, determinando aquellas colonias cuyas características morfológicas corresponden a los microorganismos sospechosos, completando la prueba con sus características microscópicas y tintoriales, confirmándose con pruebas bioquímicas. <sup>(3)</sup>

Para el caso de los medicamentos herbolarios, los ingredientes activos se encuentran en las plantas, las cuales se deben someter a algunos controles de calidad así como también todos los excipientes y materiales empleados para la elaboración y envasado del medicamento. La forma farmacéutica de un medicamento herbolario es denominada FORMA FITOFARMACÉUTICA para indicar su elaboración con materia vegetal, éste tipo de medicamentos deben cubrir patrones de calidad. <sup>(3)</sup>

El límite microbiano no debe rebasa de 100 UFC/g de plantas, ausencia de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, consideradas microorganismos patógenos, así como la ausencia de *Candida albicans* y hongos dermatofitos. Actualmente para poder permanecer y ser competitivos en el mercado, es necesario fabricar productos de calidad que satisfagan las expectativas de los consumidores. En el control de calidad se realizan varias tareas como son: control de las materias primas, producto en proceso, fabricado y terminado. La calidad de un producto puede ser afectado por: personal, instalaciones, equipo, métodos de fabricación, motivación, administración, mercado y dinero. Para eliminar todos aquellos factores que puedan alterar la calidad de los procesos y productos es recomendable hacer uso de las Buenas Prácticas de Manufacturas, pues son el conjunto de normas y actividades relacionadas entre si garantizando que los productos elaborados presenten la calidad pureza, concentración potencia e inocuidad requeridas para su uso.<sup>(3)</sup>

## **1.2 OZONOTERAPIA**

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 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 para su manejo y administración.<sup>(4)</sup>

El ozono (O<sub>3</sub>) es la unidad alotrópica del oxígeno, constituido por moléculas triatómicas de este elemento. Su existencia fue reportada en 1785 por el Químico Holándés M. Von Muran pero no fue hasta 1840 que el químico alemán Christian F. Schonbien quien asoció el olor producido por las descargas eléctricas atmosféricas; con el olor de un gas que se formaba de la electrólisis del agua, al cual llamo Ozono, que el griego significa “oloroso”. Este no puede olerse cuando su concentración supera 0.1 ppm, por que comienza a ser un gas irritante.<sup>(4)</sup>

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 propia regeneración. Ha sido postulado que los mecanismos de acción de este agente está relacionado 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, modula el sistema inmunológico, modula el estrés biológico, es un potente bactericida, fungicida y virucida.<sup>(5)</sup>

En 1857. Werner Von Siemens construyo el primer generador de ozono, el cual se basaba en la descarga constante de una chispa y simultáneamente,

el paso de aire u oxígeno a través del campo eléctrico. En 1898 otros investigadores descubrieron la forma molecular de este y su efecto bactericida. No obstante en 1916 se utilizó sistemáticamente el efecto bactericida del ozono para tratar fracturas conminutas, heridas supurantes malolientes, gangrenosas caseosas y flegmones.<sup>(6)</sup>

En 1934, se utilizó por primera vez como terapia, con ozono-oxígeno en odontología, al tratar con éxito periodontitis, granulomas dentales y otros focos infecciosos. La cual posteriormente se vio limitada porque el ozono 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.<sup>(6)</sup>

En la actualidad hay 2 sistemas generadoras de ozono: Ozonytron y Healozone.

El *Healozone*, genera ozono a partir de aire que es una mezcla de nitrógeno (~79%) y oxígeno (~21%). El ozono es conducido a través de un tubo flexible de silicona, hasta el punto que será tratado y una vez allí, sale bajo una capsula 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 del ozono que sobrepasa la concentración necesaria para la esterilización. Así pues, el exceso de ozono es aspirado de nuevo y reactivado

en el interior del aparato, es decir, vuelve a convertirse en oxígeno atmosférico.<sup>(6)</sup>

### **1.2.1 TOXICIDAD DEL OZONO**

El ozono es un gas de color azul tenue, lo que explica 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  $-193^{\circ}\text{C}$  se presenta en estado sólido y adquiere un color rojo oscuro. Su densidad en estado líquido, a  $-182^{\circ}\text{C}$ , es de  $1,572\text{ g/cm}^3$  y su masa en estado gaseoso a  $0^{\circ}\text{C}$  y  $1\text{ atm.}$ , 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 dependen de la temperatura (a  $25^{\circ}\text{C}$  se degrada el 60% en una hora). Por eso el ozono medicinal debe producirse en el momento de usarse y guardarse por un periodo corto.<sup>(7)</sup>

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 considera 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 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 inflamación.<sup>(7)</sup>

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 exposición.<sup>(7)</sup>

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, dolor de cabeza, fatiga, congestión nasal, cambios en el campo visual, lagrimeo, disminución en la frecuencia cardiaca 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.<sup>(8)</sup>

Los mecanismos para los efectos inducidos de ozono en la función pulmonar son poco comprendidos. 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 epiteliales u otras células en las vías aéreas bajas.<sup>(9)</sup>

La genotoxicidad y 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 cromátide, 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 introdujeron en el pulmón de rata, que fueron expuestas al ozono en concentraciones de 430  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  por 6 horas.<sup>(9)</sup>

### **1.2.2 EL OZONO COMO BACTERICIDA, FUNGICIDA Y VIRUCIDA**

El Ozono ( $\text{O}_3$ ), es un gas extremadamente oxidante, capaz de oxidar a la gran mayoría de los metales de alto grado de oxidación, numerosos componentes orgánicos e inorgánicos<sup>(10)</sup> lo que le confiere propiedades bactericida, fungicidas y virucidas. Esta ventaja se fundamenta en la ausencia

de colesterol en las membranas celulares de los organismos procariotas, hongos y virus, por tanto, son mucho más sensibles que las células eucariotas, lo que otorga una gran ventaja biológica a los seres vivos complejos.<sup>(11)</sup>

Su propiedad virucida está referida a que tanto el 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 de hidrógeno en su acción defensiva, siendo entonces menos tolerante a los peróxidos de ácidos grasos, por lo que pueden ser afectada por un aumento de estos, interrumpiéndose el ciclo reproductivo viral.<sup>(11)</sup>

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 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.<sup>(12)</sup>

El descubrimiento de las propiedades bactericidas y cicatrizantes del ozono permitió a los investigadores profundizar en el conocimiento de sus efectos beneficiosos. La primera constancia bibliográfica de su uso en medicina, data en la primera guerra mundial en Alemania, al realizar curas con ozono para la limpieza y desinfección de heridas sépticas de guerra. En 1935 y 1936 utilizaron por primera vez mezclas de ozono-oxígeno insuflado por vía rectal para fístulas y colitis ulcerativas. En 1950 se desarrolló el primer generador de ozono para su 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 a 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.<sup>(13)</sup>

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 de 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 agua, 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.<sup>(14)</sup>

### 1.3 CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO ANALIZADO

En este análisis se evalúa un producto mexicano (**OZONOVID**) es un producto ozono-derivado, hecho a base de aceite de semillas de uva y sustancias naturales.

Los efectos antisépticos que posee son debidos a los hidroperóxidos de ácidos grasos, que inhiben a diversos microorganismos, por lo cual, es recomendado para desinfectar heridas, acelerando el proceso de cicatrización y coadyuvante en el tratamiento de las siguientes enfermedades: escaras, pie diabético neuro-infeccioso, quemaduras de la piel, micosis, lesiones cutáneas diversas, heridas infectadas y post-quirúrgicas.

*Compuesto activo:* Aceite de uva, 10 mg/ml de hidroperóxidos de ácidos grasos.

*Dosis y modo de empleo:* Lave previamente la zona a tratar y aplique perfectamente en la parte afectada, de 3 a 4 veces al día.

*Vía de administración:* Tópica. No ingerible.

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

Este producto no es un medicamento, su empleo es responsabilidad de quien lo usa y lo recomienda.<sup>(15)</sup>

El oxígeno activo utilizado en el proceso del producto es un gas exclusivo, la molécula de oxígeno activa es triatómica, mientras la fórmula común del oxígeno con la que respiramos está formada por dos átomos. Esta propiedad es la que confiere al oxígeno activo asombrosas propiedades curativas. Se basa en su poder oxigenante y revitalizador, que se hace efectivo cuando el gas entra en contacto con las células.<sup>(16)</sup>

Una de las maneras usuales de la administración de oxígeno activo es por contacto con la piel. Por su carácter reactivo atraviesa fácilmente el tejido cutáneo, disolviéndose completamente en las células.<sup>(17)</sup>

### **1.3.1 COMPUESTO ACTIVO**

La teoría de los radicales libres, desde su introducción por Harmón en 1950, ha recibido una gran atención, y propone que las especies reactivas del oxígeno tales como el oxígeno en singulete, el anión superóxido y los radicales libres hidroxilo tienden a iniciar reacciones en cadena. La función del oxígeno es la

de ser el receptor de electrones en el enlace de flujo de electrones que generan energía en forma de adenosin trifosfato (ATP) este flujo de electrones ocurre en el interior de la membrana mitocondrial, el retículo endoplásmico y la membrana nuclear. <sup>(18)</sup>

Cuando el flujo de electrones llega a ser inacoplado, se generan radicales libres los cuales modifican el DNA, aceleran la descomposición de proteínas y dañan a los lípidos de membrana; estas alteraciones cambian la función normal de los componentes celulares.

Un *radical libre* es un fragmento molecular que contiene un electrón desapareado, se considera un enlace abierto o la mitad del mismo, interpretado químicamente reactivo.

Cuando dos radicales reaccionan, ambos son eliminados, formando un compuesto estable o una molécula reactiva nueva. Si un radical libre reacciona con una molécula que no lo es, se produce otro radical libre; esta posibilidad permite a los radicales libres a participar en reacciones en cadena, las cuales pueden ocurrir muchas veces antes de que puedan ser terminadas. <sup>(18)</sup>

Los radicales libres constituyen una gran amenaza a las células, ya que sus orígenes están en cualquier lado, pueden ser generados por el medio ambiente, por intermediarios metabólicos y por otros radicales libres. Los efectos de los radicales libres en el organismo constituyen citotoxicidad, alteración de enzimas y ácidos nucleicos, además de peroxidación de lípidos los cuales hacen perder la integridad de la membrana celular, la acumulación

de dichos efectos están íntimamente ligados con el proceso del envejecimiento.<sup>(18)</sup>

*Metabolitos del ozono: hidroperóxidos de ácidos grasos*

Las investigaciones en el campo de la química, de la 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. Sus dobles enlaces son capaces de reaccionar con el ozono a velocidades de reacción del orden de  $10^6$  moles/lit/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.<sup>(19)</sup>

Tomando en consideración las características mencionadas, 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 (metabolitos del ozono); estos metabolitos son los productos de las reacciones del ozono y/o de la descomposición de los ozónidos en condiciones fisiológicas.<sup>(19)</sup>

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 glutatión peroxidasa, que las reduce a alcoholes, a expensas del glutatión reducido (GSH), el cual, es su vez, oxidado a glutatión (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 glutatión reductasa se activa para regenerar el GSH a expensas del NADPH. Estos descubrimientos están soportados por determinaciones in vivo durante ensayos experimentales en animales y humanos, así como en ensayos in vivo, relacionados con los efectos producidos por los metabolitos del ozono en órganos sometidos a procesos de isquemia-reperfusión. <sup>(20)</sup>

Para neutralizar el estrés oxidativo, la reacción en el citoplasma se mantiene en un valor de 4:1 GSH<<GSSG por la glutatión 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 está constituida por el Shunt de la vía de las pentosas de la glicolisis, y por ello la misma glicolisis se acelera también acelerándose así la producción de ATP, causando un incremento de la disponibilidad de la energía para las células. <sup>(20)</sup>

La consecuente aceleración del intercambio del GSH y la glicolisis es la consecuencia final del efecto de los mencionados hidroperóxidos de cadena corta 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.<sup>(20)</sup>

#### **1.4 ANTISÉPTICOS.**

Diferencia entre desinfectante y antiséptico:

Desinfectante: Es un producto (agente químico), utilizado para matar microorganismos en objetos o superficies.<sup>(21,,22)</sup>

Antiséptico: Agente químico que generalmente es de amplio espectro, que inactiva microorganismos o destruye o inhibe el crecimiento de microorganismo dentro o en tejidos vivos.<sup>(21,22)</sup>

Desinfección: Es la destrucción de microorganismos patógenos en superficies inanimadas o inertes mediante la utilización de unos productos químicos denominados desinfectantes.<sup>(22, 23)</sup>

Antisepsia: Es la destrucción de microorganismos patógenos en tejidos vivos (piel, tracto genital, tracto urinario, heridas, etc.) mediante la aplicación de un producto llamado antiséptico.<sup>(22, 23)</sup>

La acción antibacteriana de los antisépticos y desinfectantes depende generalmente de la temperatura, tiempo y concentración; pues a

concentraciones muy bajas pueden ser inhibitorias y concentraciones todavía mayores pueden ser bactericidas para ciertos organismos,<sup>(24)</sup>

Se considera que un antiséptico es eficaz cuando tras su aplicación se observa (según las normas AFNORa francesa):

- a) Una disminución del número de microorganismos (menos de 100 000 colonias), en 5 minutos, en al menos cuatro tipos de cepas bacterianas de referencia.
- b) Que la actividad de los antisépticos se puede inhibir en presencia de ciertas materias orgánicas (sangre, restos de tejido, etc.).
- c) Que las soluciones antisépticas pueden ser contaminadas por microorganismos que se transmiten por el aire, por las manos e instrumental y por el material de curas.<sup>(24)</sup>

#### **1.4.1 RECOMENDACIONES PARA LA UTILIZACIÓN DE 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.

- ✓ 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 o para la ducha, limpieza de manos, etc. Es importante recortar esta premisa cuando se realice la limpieza de la herida con sustancias jabonosas.

El *antiséptico ideal* debería cumplir con las siguientes características:

- ✓ Amplio espectro de actividad.
- ✓ Baja capacidad de generar resistencia.
- ✓ 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 rápida.
- ✓ No ser ni irritante, ni sensibilizante.
- ✓ No teñir los tejidos.
- ✓ Ser efectivo, incluso ante la presencia de pus, exudado, tejido esfacelado.

## 1.5 DEFENSAS CONSTITUTIVAS DEL CUERPO

La piel es el órgano más accesible del cuerpo humano; su función básica consiste simplemente en proteger. Como barrera, evita la desecación y enfermedad conservando la humedad adentro y los patógenos afuera. Cuando el microorganismo cruza la epidermis o la superficie epitelial de las mucosas, enfrenta componentes de las defensas constitutivas del huésped. Las defensas constitutivas del cuerpo humano son barreras inespecíficas contra las enfermedades infecciosas que no necesitan contacto previo con el microorganismo. Estas defensas consisten en barreras físicas y químicas sencillas que evitan el fácil ingreso de los microorganismos al cuerpo. En condiciones normales el cuerpo humano aloja numerosas especies de bacterias, virus, hongos y protozoarios. La mayor parte son *comensales* o “*flora normal*”, definidos como microorganismos que viven sobre o dentro del huésped humano, pero que rara vez producen enfermedad.<sup>(25)</sup>

La flora normal evita la colonización mediante numerosos mecanismos; promueve la producción de anticuerpos capaces de reacción cruzada con los microorganismos colonizadores, desconocidos para el sistema inmune del huésped. La enfermedad infecciosa se presenta cuando el microorganismo patógeno produce signos o síntomas de inflamación o disfunción orgánica; entre el espectacular conjunto de trastornos cutáneos neoplásicos, inflamatorios, infecciosos y genéticos, algunos sólo producen aberraciones triviales en la estructura o función cutáneas, mientras que otros tienen consecuencias profundas y mórbidas.<sup>(26)</sup>

## 1.6 MECANISMOS DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

1. Los agentes infecciosos pueden entrar en contacto o penetrar en las células del huésped y causar la muerte celular de manera directa.
2. Los patógenos pueden liberar endotoxinas o exotoxinas que matan las células a distancia, sintetizar enzimas que disgregan los componentes hísticos o dañan los vasos sanguíneos, con la consiguiente aparición de lesiones isquémicas.
3. Los microorganismos pueden desencadenar respuestas en las células del huésped que provocan un mayor daño en los tejidos, en general mediante mecanismos inmunitarios.<sup>(26)</sup>

## 1.7 FLORA PATÓGENA EN FUNCIÓN DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN DEL PRODUCTO.

### 1.7.1 Infecciones por estafilococos.

El género *Staphylococcus* está constituido por cocos gran positivos con tendencia agruparse formando racimos. Son inmóviles, da 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 de las demás, 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*.<sup>(27)</sup>

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 de microorganismos, desde el que fácilmente alcanza la piel. La colonización es más frecuente en personal sanitaria, en diabéticos insulino dependientes, en pacientes en hemodiálisis o con enfermedades dermatológicas crónicas y en usuarios de drogas parenterales.<sup>(27)</sup>

#### **1.7.1.1 Patogenia**

La capacidad patogénica de *S. aureus*, además de su capacidad para diseminarse y multiplicarse en los tejidos del hospedador, algunos elementos de su pared celular tienen la capacidad de sintetizar numerosas enzimas y toxinas.<sup>(27)</sup>

#### **1.7.1.2 Componentes de la pared celular**

El componente básico de la pared de *S. aureus* es el peptidoglucano. Representa el 50% del peso de la pared celular y proporciona forma y estabilidad al microorganismo. Además tiene importantes propiedades biológicas: presenta actividad endotóxica, la cual desencadena la producción de Interleucina I por los monocitos, estimula la quimiotaxis y la agregación de los leucocitos, activa el complemento e induce la producción de anticuerpos opsonizantes.<sup>(27)</sup>

Otros componentes de la pared celular son los ácidos teicoico, que representan hasta el 40% de su peso, son los 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, la cual tienen la capacidad de inducir la producción de anticuerpos, además, la capa externa de peptidoglucano incorpora, mediante unión covalente, distintas proteínas: 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 Ig G, por lo que previene la eliminación del microorganismo mediada por anticuerpos<sup>(27)</sup>

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 polimorfo nucleares y aumenta, en ciertas condiciones, su capacidad de adherencia.<sup>(27)</sup>

### 1.7.1.3 Enzimas

Casi todas las cepas de *S. aureus* sintetizan diferentes sustancias como actividad enzimática, entre las que destacan las siguientes<sup>(28)</sup>

- a) *Catalasa*. Desdobla el peróxido de hidrógeno, tóxico para el microorganismo, en agua y oxígeno.
- b) *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.
- c) *Hialuronidasa*. Hidroliza el ácido hialurónico, mucopolisacárido que forma parte de la matriz acelular del tejido conectivo.
- d) *Penicilinasa*. Producida en la actualidad por casi todas las cepas de *S. aureus*, inactiva la penicilina mediante la hidrólisis de su anillo  $\beta$ -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.<sup>(28)</sup>

#### **1.7.1.4 Toxinas.**

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

- a)** *Toxinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ .* 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  $\alpha$  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.<sup>(28)</sup>
- b)** *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.<sup>(29)</sup>
- c)** *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.<sup>11</sup>

**d) Enterotóxicas.** 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.<sup>(27)</sup>

**e) 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 súper-antígeno. 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 citotóxico.<sup>(27)</sup>

#### **1.7.1.5 Manifestaciones clínicas.**

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.<sup>(29)</sup>

#### **1.7.1.6 Infecciones de la piel.**

*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. 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).<sup>(28)</sup>

El impétigo es una infección superficial de la piel que afecta con mayor frecuencia a niños en áreas expuestas, comienza con la aparición de vesículas de contenido blanquecino sobre una base eritematosa que al romperse producen una costra amarillenta.<sup>(26)</sup>

### **1.7.2 Infecciones por *Pseudomonas*.**

Los microorganismos del género *Pseudomonas* son bacilos gran negativos 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.<sup>(30)</sup>

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. oryzihabitans*, *P. pseudoalcaligenes* y *P. stutzeri*.<sup>(30)</sup>

### **1.7.2.1 Patogenia.**

*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. Posee múltiples factores de virulencia. Probablemente su potencial patógeno deriva de la combinación de la expresión de varios de ellos. Estudios recientes sugieren que la regulación de muchos de estos factores depende de un proceso de quórum-sensing. Las bacterias producen acilhomoserina, lactona que puede difundir libremente a uno y otro lado de la membrana externa de la bacteria. De este modo, la concentración intracelular es reflejo de la extracelular, lo que permite al microorganismo percibir la existencia de otros individuos de la población en su proximidad. Cuando se ha alcanzado una masa crítica, los reguladores del sistema quórum-sensing (Las y RhL) inducen la expresión de diferentes genes de virulencia (elastasa, proteasa alcalina, cianuro, exotoxina A, catalasa, sistemas de secreción de proteínas, ramnolípido, piocianina, lectinas, superóxido dismutasa, lactosas). *Pseudomonas aeruginosa* puede adherirse tanto a células epiteliales como a superficies inertes.<sup>(23)</sup>

### **1.7.2.2 Componentes de la pared celular.**

*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 xilosa. Posee una compleja membrana externa en la que se integran una porina principal (OprO) 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 microorganismo. <sup>(23)</sup>

## 1.8 JUSTIFICACIÓN

Los productos fitofarmacéuticos juegan un papel importante en la salud poblacional, ya que en varios países se comercializan y se consumen; por tal motivo es importante llevar a cabo un control de calidad sanitario, para asegurar que el producto que se está consumiendo se encuentre libre de contaminación bacteriana, de acuerdo a los estándares establecidos en las normas.

Por tal motivo, este trabajo se enfoca al estudio de la presencia bacteriana en un producto fitofarmacéutico (Ozonovid-antiséptico), cuya aplicación clínica abarca como coadyuvante en el tratamiento de heridas infectadas, heridas postquirúrgicas, quemaduras de la piel. Tomando como referencia los límites microbianos establecidos en la **NOM-089-SSA 1-1994**, que establece los métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza, para asegurar que estén libres de contaminación y sean aptos para el uso humano.

La posible presencia de bacterias como: *S. aureus* y *P. aeruginosa*, confirman una calidad sanitaria deficiente en un producto fitofarmacéutico, el cual puede afectar la salud del consumidor y por lo tanto su falta de validez del control de calidad del mismo.

## 1.8 HIPÓTESIS

Sí existe crecimiento bacteriano en la crema antiséptica rebasando los límites microbianos establecidos en la **NOM-089-SSA 1-1994**, complementados con la FEUM, entonces no será apto para su uso debido a su invalidez en el control de calidad.

## 2.0 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el control sanitario en la crema y su principio activo que se encuentra en el aceite de semilla de uva, que sirve como coadyuvante en el tratamiento de lesiones cutáneas, infecciones bacterianas y micóticas (Ozonovid), para analizar si cumple con los requisitos de calidad que establece la Norma Oficial Mexicana.

## 2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Verificar que la crema y el aceite de semilla de uva sean inocuos y libres de contaminación bacteriana.
- ✓ Determinar la presencia de microorganismos objetables (*S. aureus* y *P. aeruginosa*) para asegurar la calidad del producto.
- ✓ Evaluar la efectividad del preservativo antimicrobiano a la crema y al aceite de semilla de uva.
- ✓ Realizar un desafío microbiano al aceite de semilla de uva para corroborar si su concentración es la idónea.
- ✓ Investigar bibliográficamente acerca de los metabolitos de ozono, donde los hidroperóxidos de ácidos grasos confieren las propiedades antisépticas y/o bactericidas.

### **3.0 MATERIAL Y EQUIPO** (Ver anexo B)

### **4.0 MÉTODOS**

#### **4.1 TOMA DE MUESTRA (del producto)**

1. Analizar la muestra tan pronto como sea posible. Si es necesario almacenar, debe hacerse a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , no congelar la muestra antes o después de su análisis.
2. Inspeccione las muestras cuidadosamente antes de abrirlas y anote cualquier irregularidad del contenedor de dichas muestras.
3. Desinfecte la superficie del contenedor con un algodón estéril impregnado con una solución de etanol al 70% (v/v).
4. Antes de abrir y tomar la muestra o contenido, secar la superficie con gasa estéril.
5. Homogeneizar con una espátula el producto (semisólido) al tomar la muestra necesaria.

#### **4.2 PREPARACIÓN DE LA MEZCLA BACTERIANA**

1. Obtener un cultivo de 24 hr de: *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurum*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*.
2. Hacer una dilución igualando al tubo 0.5 de Mc Farland de cada una de las bacterias.
3. Tomar 1 ml de cada dilución (bacteria) y ponerlo en un tubo aparte (estéril).

## 5.0 PROCEDIMIENTO <sup>(1)</sup>

### 5.1 PRUEBA DE ESTERILIDAD

1. En frascos estériles con 90 ml de Caldo Soya, Caldo Lactosado, Caldo Tioglicolato, cada frasco adicionar 1 ml de Tween 80 (0.5%, estéril).
2. Adicionar 10 g de muestra (producto terminado y aceite de semilla de uva).
3. Incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante 24 a 48 hr el Caldo Soya, Caldo Lactosado, y el Caldo Tioglicolato incubarlo durante 7 días.
4. En una caja petri con Agar BHI (Infusión-cerebro-corazón), poner un inóculo de 0.5 ml y expandir por sembrado masivo.
5. Incubar nuevamente a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 hr a 48 hr.
6. Si no hay crecimiento, se reporta como  $<10$  UFC/g muestra.
7. Si hay crecimiento; buscar microorganismos objetables (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*) por NMP (número más probable), mesófilos e incluir Hongos filamentosos y Levaduras.

Nota: UFC = Unidades formadoras de colonias. Rotular todas las cajas con fecha, clave del producto. (Ver diagrama en anexo C-1)

### 5.2 Cuenta total de mesófilos (vaciado en placa)

1. En 4 cajas estériles adicionar 1 ml de la muestra con Tween 80 (pipeta estéril).
2. Agregar aproximadamente 25 ml del medio de agar cuenta estándar.

3. Rotar las cajas para homogenizar (7 izquierdas y 7 derechas).
4. Solidificar el medio.
5. Incubar 2 cajas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 a 48 hr.
6. Incubar las 2 cajas restantes a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (temperatura ambiente) durante 24 a 48 hr.
7. Contar colonias existentes.
8. Si no hay crecimiento reportar  $<10$  UFC/g muestra. (*Ver diagrama en anexo C-2*)

### **5.3 Cuenta de hongos y levaduras**

1. Procedimiento similar al de cuenta total de mesófilos solo que el medio que se utiliza es de agar dextrosa papa (PDA).
2. Incubar a temperatura ambiente ( $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante 5 días en el caso de hongos filamentosos y para levaduras a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 hr.
3. Si no hay crecimiento reportar como  $< 10$  UFC/g muestra en el caso de levadura y en hongos poner la especie encontrada. (*Ver diagrama en anexo C-3*)

### **5.4 Número más probable (NMP)**

1. Preparar y rotular 12 tubos de rosca con tubo Durham; 9 tubos con 10 ml de caldo lactosado rojo de fenol y 3 tubos con 20 ml.

2. A 3 tubos con 10 ml de caldo se coloca 0.1 ml de muestra con Tween 80 (dilución  $10^{-3}$ ).
3. A otros 3 tubos agregar 1 ml de muestra con Tween 80 (dilución  $10^{-2}$ ).
4. A otros 3 tubos se colocan 10 ml de muestra con Tween 80 (dilución  $10^{-1}$ ).
5. Los últimos 3 tubos se toman como control negativo.
6. Incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 48 hr.
7. Observar si no hay cambio de vire a amarillo y producción de gas.
8. Si hay se colocan 0.5 ml del tubo positivo a un tubo que contenga 10 ml de Caldo bilis verde brillante con campana Durham, e incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 a 48 hr (coliforme total).
9. Si hay cambio de vire a amarillo con producción de gar, pasar 0.5 ml a otro tubo que contenga caldo bilis verde brillante a  $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 a 48 hrs (coliforme fecal).
10. Si hay crecimiento (vire del medio a amarillo) con producción de gas, se coloca una asada en medio de Mc Conkey.
11. Aislar bacteria e identificar con pruebas bioquímicas primarias y secundarias para su identificación. (ver anexo-tabla3)
12. El NMP se determina de acuerdo al número de tubos que presenten crecimiento bacteriano y/o gas de cada serie inoculada, y reportar en base a la tabla que se encuentra en el anexo A tabla no. 8. (Ver diagrama en anexo C-4)

## 5.5 DETERMINACIÓN DE *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

1. En un tubo que contiene 5 ml de caldo soya tripticaseína (estéril), se colocan 5 ml de la muestra con Tween 80.
2. Incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 a 48 hr.
3. Si existe crecimiento bacteriano en la superficie, sembrar una asada en agar cetrimida.
4. Identificar la bacteria mediante pruebas bioquímicas primarias y secundarias

Nota: para el caso de *S. aureus* se coloca una asada en medio de Agar sal y manitol e identificar con pruebas bioquímicas primarias y secundarias. (Ver anexo A tabla no.9 y diagrama en anexo C-5)

## 5.6 EFECTIVIDAD DEL PRESERVATIVO ANTIMICROBIANO <sup>(31)</sup>

### 5.6.1 Crema semisólida

1. En un frasco con 20 ml de PBS, adicionar 1 ml de Tween 80 al 0.5% (estéril).
2. Adicionar 10 g de la muestra y homogenizarla, poniendo el frasco en baño maría a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  hasta formar una emulsión homogénea (no mayor a 15 min).
3. Adicionar 0.01 ml de la mezcla bacteriana.
4. Incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante: 0 min, 30 min, 60 min, 2 hr, 4 hr, 24 hr, 48 hr, y 7 días.

5. Tomar una alícuota de 1 ml de cada uno de los tiempos y adicionar 20 ml de agar Leetheen, homogenizar con movimientos rotatorios (7 izquierdas y 7 derechas).
6. Solidificar el medio.
7. Incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 a 48 hr.
8. Realizar un conteo de colonias y reportar como UFC/g de muestra.

*(Ver diagrama en anexo C-6)*

#### **5.6.2 Aceite de semilla de uva**

1. En un tubo con 1 ml de PBS, adicionar 0.5 ml de Tween 80 al 0.5% (estéril).
2. Adicionar 0.5 g de la muestra y homogenizar la muestra poniendo el matraz en baño maría a  $45^{\circ}\text{C}$  hasta formar una emulsión homogénea (no mayor a 15 min).
3. Adicionar 5  $\mu\text{l}$  de la mezcla bacteriana.
4. Incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante: 0 min, 30 min, 60 min, 2 hr, 4 hr, 24 hr, 48 hr, 7 días.
5. Tomar una alícuota de 150  $\mu\text{l}$  de cada uno de los tiempos y adicionar 3 ml de agar Leetheen, homogenizar con movimientos rotatorios (7 izquierdas y 7 derechas).
6. Solidificar el medio.
7. Incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 a 48 hr.
8. Realizar un conteo de colonias y reportar como UFC/ml. *(Ver diagrama en anexo C-7)*

### 5.7 DESAFÍO MICROBIANO AL ACEITE DE SEMILLA DE UVA <sup>(32)</sup>

1. Tomar una alícuota de 0.8 ml del frasco original del aceite de semilla de uva y ponerla en un tubo que contenga 0.2 ml de PBS.
2. A la solución anterior adicionarle 5 ml de PBS para tener una concentración de 1000 µg.
3. Del mismo tubo anterior separar 3 ml en otro tubo estéril el cual uno será el control negativo y el otro servirá para hacer diluciones.
4. Tomar una alícuota de 2.7 ml y ponerlo en un tubo que contenga 0.3 ml de caldo BHI.
5. Tomar una alícuota de 2.66 ml en un tubo que contenga 0.34 ml de caldo BHI.
6. Tomar una alícuota de 2.63 ml en un tubo que contenga 0.34 ml de caldo BHI.
7. Tomar una alícuota de 2.57 ml en un tubo que contenga 0.34 ml de caldo BHI.
8. Tomar una alícuota de 2.5 ml en un tubo que contenga 0.34 ml de caldo BHI.
9. Tomar una alícuota de 2.4 ml en un tubo que contenga 0.34 ml de caldo BHI.
10. Tomar una alícuota de 2.25 ml en un tubo que contenga 0.34 ml de caldo BHI.
11. Tomar una alícuota de 2.0 ml en un tubo que contenga 0.34 ml de caldo BHI.
12. Tomar una alícuota de 1.5 ml en un tubo que contenga 0.34 ml de caldo BHI.
13. Adicionar una alícuota de 15 µl de la mezcla bacteriana (0.5 Mc farland) a cada tubo
14. Homogenizar bien y tomar 3 alícuotas de 15 µl de cada dilución y ponerlo en gota sin extender sobre una caja de petri que contenga BHI.
15. Incubar a 37°C durante 24 a 48 hr.
16. Contar colonias y reportar las UFC/ml de muestra.

## 6.0 RESULTADOS

De acuerdo con las *pruebas de esterilidad* y en conjunto con el recuento de mesófilos aerobios, hongos y levaduras, se reportan resultados favorables en cuanto a la calidad de la muestra analizada como se observa en la tabla no. 1; mostrando así el crecimiento bacteriano en UFFC obtenidas después del tiempo de incubación a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , exceptuando par a hongos filamentosos que es a  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , desde 24hr hasta 7 días respectivamente.

Tabla No.1 Prueba de esterilidad y mesófilos aerobios

<b>Medio</b>	<b>Lectura a 24 hr</b>	<b>Lectura a 48 hr</b>	<b>Lectura a 7 días</b>
<b>Infusión Cerebro Corazón (BHI)</b>	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
<b>Caldo Soya Trypticaseína (CST)</b>	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
<b>Caldo Leetheen</b>	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
<b>Caldo tioglicolato</b>	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
<b>Agar cuenta estándar (ACS) Mesófilos aerobios</b>	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
<b>Agar papa dextrosa (APD/ 37 °C) Levaduras</b>	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
<b>Agar papa dextrosa (APD/ 27°C) Hongos</b>	Negativo	Negativo	Negativo

En la *evaluación de la efectividad del preservativo antimicrobiano*, se utilizo una mezcla de bacterias de interés común, las cuales fueron identificadas tanto por pruebas bioquímicas primarias y secundarias para asegurar su pureza, las

cuales fueron adicionadas a la muestra para desafiarlas y conocer el tiempo en que la crema comienza a tener su efecto bactericida, desde el inicio del contacto (tiempo cero) hasta los 7 días, como se muestra en la tabla no. 2, la cual refleja que después de una hora, comienza su efecto inhibiendo notablemente el crecimiento bacteriano.

Tabla No.2 Evaluación de la efectividad del preservativo antimicrobiano.

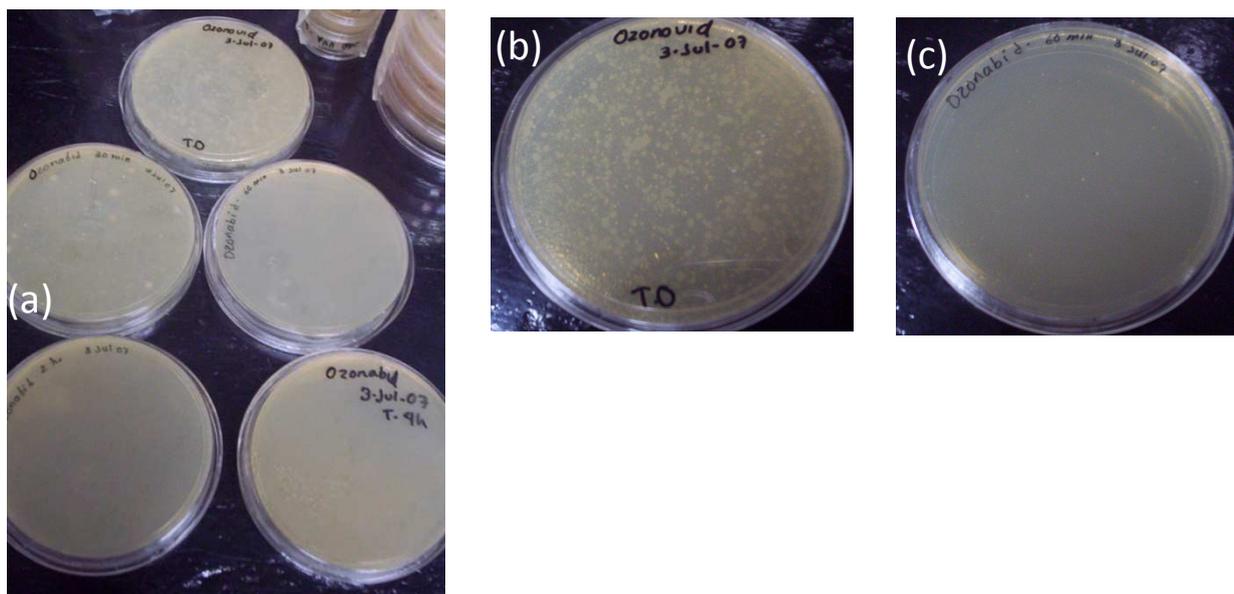
Muestra	0 min	30 min	60 min	2 hr	4 hr	24 hr	48 hr	7 días
Producto terminado	Incont	102 UFC	3 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
Aceite de semilla de uva	Incont	204 UFC	< 10 UFC					

**Incont. = incontable**

La figura No.1 (a) muestra una serie de placas donde se observa notablemente como va disminuyendo la carga microbiana, desde el tiempo 0 hasta las 4 hrs.

(b) En la placa de agar Leethen, muestra la gran cantidad de microorganismos presentes desde el inicio de la mezcla de bacterias junto con la crema antiséptica, en la cual no se aprecia el efecto inhibitorio. (c) Misma placa de agar Leethen, muestra que después de una hora de incubación en contacto de la crema con la mezcla de bacterias, se aprecia el efecto inhibitorio total de los microorganismos.

Fig. No.1



En el *desafío microbiano* realizado al aceite de semilla de uva, se hizo con el fin de observar si a menor concentración de la que está estipulada pudiera inhibir el crecimiento bacteriano, siendo muy notable que no tiene ningún efecto bactericida hasta la concentración de 1000µg/ml como lo indica el producto, resultados mostrados en la tabla no. 3; así mismo observando un poco de resistencia en *E. coli* y *C. albicans*.

Tabla No.3. Desafío microbiano al aceite de semilla de uva.

Bacteria	Concentración (µg/ml)											
	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	
<b>Candida albicans</b>	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.
<b>Salmonella Typhimurium</b>	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	16 colonias = 5.33x10 <sup>7</sup> UFC
<b>E. coli</b>	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.
<b>S. aureus</b>	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	115 colonias = 3.8 x 10 <sup>8</sup> UFC

**Incont.= Incontable**

Se realizando los siguientes cálculos para la conversión del número de colonias a Unidades Formadoras de Colonias ( UFC).

$$(n/V) \times 10^8$$

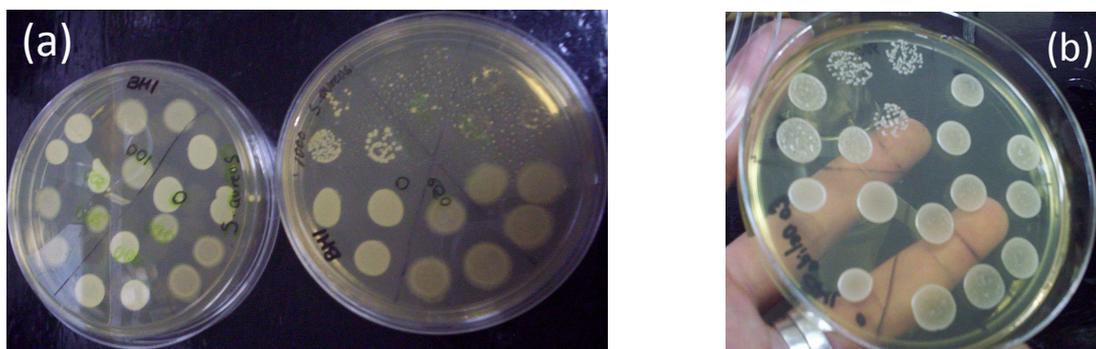
donde n= número de colonias; V = volumen de alícuota;  $10^8$ = factor de dilución

$$S. \textit{tiphymurium} = (16 \text{ colonias} / 30\mu\text{l}) \times 10^8 = 5.33 \times 10^7 \text{ UFC/ml}$$

$$S. \textit{aureus} = (115 \text{ colonias} / 30 \mu\text{l}) \times 10^8 = 3.8 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

En la figura No. 2, muestra una placa de BHI, con 3 gotas de 10  $\mu$ l por cada concentración, en la cual se observa cómo va disminuyendo el crecimiento bacteriano conforme aumenta la concentración del antiséptico en el desafío microbiano: a) *S. aureus*; (b) *C. albicans*.

Fig. No. 2



Después de 7 meses se evaluó nuevamente la crema y el aceite de semilla de uva, con las mismas pruebas, mismas condiciones de trabajo, para dar a relucir si mantiene su efectividad. En la tabla no. 4 se muestra los resultados de la prueba de esterilidad y recuento de mesófilos aerobios, hongos y levaduras, revelando resultados satisfactorios, observando

notablemente que sigue siendo confiable al no mostrar carga bacteriana a pesar del tiempo.

Tabla No.4 Prueba de esterilidad y mesófilos aerobios a los 7 meses.

<b>Medio</b>	<b>Lectura a 24 hr</b>	<b>Lectura a 48 hr</b>	<b>Lectura a 7 días</b>
<b>Infusión Cerebro Corazón (BHI)</b>	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
<b>Caldo Soya Trypticaseína (CST)</b>	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
<b>Caldo Leetheen</b>	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
<b>Caldo tioglicolato</b>	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
<b>Agar cuenta estándar (ACS) Mesófilos aerobios</b>	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
<b>Agar papa dextrosa (APD/ 37 °C) Levaduras</b>	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
<b>Agar papa dextrosa (APD/ 27°C) Hongos</b>	Negativo	Negativo	Negativo

Sin embargo, los resultado obtenidos de la *evaluación de la efectividad del preservativo antimicrobiano* realizado a los 7 meses, mostrados en la tabla no. 5, revelan que existe un crecimiento bacteriano abundante, los cuales comparados con los resultados anteriores de la tabla no.2, es evidente el cambio tan drástico señalando su nula efectividad, ya que ahora no se aprecia el efecto antimicrobiano a los 60 min como anteriormente se había manifestado.

Tabla No.5 Evaluación de la efectividad de preservación a los 7 meses

Muestra	0 min	30 min	60 min	2 hr	4 hr	24 hr	48 hr	7 días
Producto terminado	Incont.							
Aceite de semilla de uva	Incont.							

**Incont. = incontable**

Así mismo, se llevó a cabo equitativamente las mismas pruebas efectuadas a *cremas comerciales*:

a) *Vitacilina*: ayuda a la cicatrización y actúa como bactericida y

b) *Pond's S* : suavizante de la piel.

Las cuales representan el *control positivo y negativo* respectivamente, indicadas en la tabla no.6, para comparar la calidad y cantidad microbiana que existe en un producto que se encuentra en el mercado; en dichas cremas no se observa crecimiento bacteriano, indicativo de un producto estéril y confiable.

Tabla No.6 Prueba de esterilidad y mesófilos aerobios a cremas control

Medio	Vitacilina			Pond's S		
	Lectura a 24 hr	Lectura a 48 hr	Lectura a 7 días	Lectura a 24 hr	Lectura a 48 hr	Lectura a 7 días
Infusión Cerebro Corazón (BHI)	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
Caldo Soya Tripticaseína (CST)	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
Caldo Leetheen	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
Caldo tioglicolato	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
Agar cuenta estándar (ACS) <sup>Mesof</sup>	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
Agar papa dextrosa (APD/ 37 °C) <sup>Levaduras</sup>	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC	< 10 UFC
Agar papa dextrosa (APD/ 27°C) <sup>Hongos</sup>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Al realizar la evaluación de la *efectividad de preservación antimicrobiano a las cremas control*, reflejan que existe crecimiento bacteriano abundante, indicativo de que no hay ningún efecto bactericida en ninguna de las dos cremas, deduciendo que la vitacilina tiene un efecto bactericida muy débil, porque no produce algún efecto en los microorganismos de prueba utilizados, como se muestra en la tabla no. 7

Tabla No.7 Evaluación de la efectividad de preservación a cremas control

<b>Muestra</b>	<b>0 min</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>	<b>2 hr</b>	<b>4 hr</b>	<b>24 hr</b>	<b>48 hr</b>	<b>7 días</b>
<b>Vitacilina (+)</b>	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.
<b>Pond's S (-)</b>	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.	Incont.

(+) control positivo; (-) control negativo.

## 7.0 DISCUSIÓN

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, en el cual estos últimos son los que se encuentran dentro de la formulación de la crema a estudiar. 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.

De acuerdo a la norma (NOM-089-SSA 1-194) establece métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza, el cual se complementa con la Farmacopea de los Estado Unido Mexicanos (FEUM), para asegurar la calidad del (los) producto (s), dirigidos al consumo humano, llevando un conjunto de pruebas que tienen como finalidad la evaluación de la calidad sanitaria de dichos productos, mediante el recuento de microorganismos mesófilos aeróbios, hongos filamentosos y levaduras; así como la investigación de microorganismo objetables (*S. aureus*, *P. aeruginosa*).

Con las técnicas llevadas a cabo, basadas en la norma, los resultados de las tablas No. 1, 4 y 6, correspondientes a la esterilidad, recuento de mesófilos

aerobios, hongos filamentosos y levaduras, tanto del producto inicial como después de un lapso de 7 meses, así como de los productos control, muestran que no hay crecimiento de microorganismos, reportándose como  $<10 \text{ UFC}^{(1)}$ , señalando que no hay cuenta viable de mesófilos aerobios ni de ningún otro tipo de microorganismo presente, en los medios de Infusión Cerebro Corazón (BHI, es un medio nutritivo, en el cual puede crecer microorganismos exigentes, favoreciendo el desarrollo de aerobios y anaerobios), Caldo soya tripticaseína (CST, favorece el crecimiento bacteriano de diferente índole debido a que tiene 2 peptonas), donde no hay crecimiento de mesófilos aerobios, caldo Leethen (es un medio altamente nutritivo con agentes neutralizantes para componentes compuestos de amonio cuaternario y útil en pruebas e desinfectantes) y por último el caldo tioglicolato (es utilizado para productos farmacéuticos que debido a la actividad del grupo sulfhídrico nulifica la posible toxicidad de compuestos mercuriales y otros productos farmacéuticos, neutralizando el efecto bacteriostático).<sup>(27)</sup>

Agar cuenta estándar (ACS, es un medio que contiene los nutrientes esenciales para que crezca cualquier bacteria aerobia: como caseína, dextrosa y levadura, resultando útil porque indica si la limpieza, la desinfección y control de temperatura durante los procesos de tratamiento industrial, transporte y almacenamiento se han realizado en forma adecuada) y Agar papa-dextrosa (PDA, favorece el crecimiento de hongos y levaduras, ya que estas crecen más lentamente que las bacterias en productos no ácidos que conservan la humedad, sin embargo, en los productos ácidos y en los de baja actividad de agua, crecen con mayor rapidez que las bacterias, motivo por el cual se le adiciona al medio ácido tartárico al 10%, este es importante porque existe el

peligro potencial de producción de micotoxinas por parte de los hongos, donde algunos metabolitos fúngicos pueden inducir el cáncer, ejemplo de ellos la aflatoxina proveniente de *Aspergillus flavus*, contaminante natural de semillas).

(33)

Los resultados de la *evaluación de la efectividad del preservativo antimicrobiano* efectuado a la crema y el aceite de semilla de uva, reportados en la tabla no. 2, es una prueba para demostrar si es posible recuperar las bacterias de prueba, previamente inoculada a las muestras, ya que los preservativos son agentes antimicrobianos no antibióticos que se adicionan principalmente a los preparados farmacéuticos multidosis para protegerlos de la contaminación por microorganismos. <sup>(31)</sup>

Los microorganismos de prueba utilizados en el desafío fueron: *E. coli* (ATCC 10536), *S. aureus* (ATCC 6538), *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* (ATCC 15442) y *Canida albicans* (ATCC 10231), los cuales fueron inoculados como una suspensión ajustada al 0.5 de Mc Farland cada una previamente, para evaluar el tiempo aproximado en que esta comienza a inhibir el crecimiento bacteriano. <sup>(1)</sup>

Analizando la tabla no.2, se puede deducir que existe un efecto bactericida notable a partir de los 30 min, teniendo un crecimiento nulo a los 60 min, ya que el crecimiento bacteriano en el tiempo cero es incontable.

Sin embargo, al analizar las muestras nuevamente a los 7 meses, resultados reportados en la tabla no. 5, se observa que ya no tiene un efecto bactericida, existiendo crecimiento incontable durante todo el tiempo estipulado en la prueba, es decir que la crema de Ozonovid y el aceite de semilla de uva, pierde su efecto bactericida y/o antiséptica antes de los 7 meses, estos

resultados determinan el tiempo posible de caducidad del producto, dando a conocer que el principio activo ozonificado pierde su actividad como antiséptico.

Cabe mencionar que no se realizó más pruebas con respecto al tiempo, por falta de materia prima, en la cual podría haber sido monitoreado cada 15 días para especificar exactamente el tiempo del efecto bactericida de la crema.

Por el contrario, al realizar la *evaluación de preservación a cremas control*, que se encuentran actualmente en el mercado, se utilizó a la Vitacilina como control positivo, porque actúa como bactericida y a la crema Pond's S como control negativo por ser una crema humectante. De acuerdo a los resultados reportados en la tabla no. 7, se observa que no hay ningún efecto bactericida al existir un crecimiento bacteriano en ambas cremas, lo cual es evidentemente que la Vitacilina tiene un efecto bactericida débil, como para haberlo tomado como positivo.

El *desafío microbiano* realizado al *aceite de semilla de uva* con los mismos microorganismos de prueba utilizados en la evaluación de preservación, resultados reportados en la tabla no. 3, es para corroborar si la concentración que está manejando, es la correcta para tener su efecto bactericida como antiséptico, o si pudiese ser a una menor concentración, en la cual se tomaron de 100 en 100 µg/ml hasta llegar a la concentración indicada en el frasco (1000 µg/ml). Resultados que denotan que la concentración a la

que inicia el efecto bactericida es efectivamente a partir de 1000 µg/ml y no a una concentración menor.

Por tanto, conforme a los resultados obtenidos de dichas pruebas se muestra la calidad microbiana de Ozonovid, la cual es una crema que contiene un efecto bactericida, debido a los metabolito del ozono, el cual es uno de los descubrimientos utilizados en la medicina alternativa.

El ozono como tal, en cualquier sistema biológico es muy breve, ya que existen sustancias que reaccionan rápidamente con el ozono (ácidos grasos insaturados, libre o forman parte de los lípidos) por ese motivo los efectos beneficiosos del ozono sistémico en el organismo, así como la mayoría de los efectos locales se debe a los metabolismo de ozono, provenientes de la ruptura de ácidos grasos insaturados, que son similares a los peróxidos lípidicos endógenos, en la cual son hidrofílico y de muy bajo peso molecular, por lo cual penetran con gran facilidad por las membranas celulares. <sup>(13)</sup>

Pero por ser un gas extremadamente reactivo, el uso del ozono ha sido un tema controvertido ya que por un lado se dice que es un contaminante ambiental con poder oxidante y capaz de producir efectos secundarios, causando inflamación en los tejidos pulmonares con posterior fibrosis cuando se pone en contacto tanto en humanos como en animales, en dosis superiores a 1.2 µg/ml por vía inhalatoria y superiores a 100 µg/ml por vía parenteral, pero si se utiliza a bajas dosis, este puede ser utilizado para fines terapéuticos en

una relación 95:5 de O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>, la cual es 30 veces menos que la utilizada en la industria (1.5 µg/ml de oxígeno).<sup>(52)</sup>

En los últimos 20 años se realizaron estudios en la antigua Unión Soviética y actualmente en Cuba, donde demuestran que al ser introducido al organismo en pequeñas cantidades mejora la calidad de vida de las personas debido a su propiedades moduladoras del sistema inmune, anti infecciosas, estimulantes del metabolismo de los glóbulos rojos y del oxígeno, así como reguladoras del llamado estrés oxidativo, este último asociado a unas 250 enfermedades o trastornos. Ya que los radicales libres provocan daño en la membrana celular, por lo que la regulación de este estrés oxidativo es una importante influencia para recuperar la salud. Las concentraciones y modo de aplicación varían enormemente en función del problema a tratar, ya que la concentración del ozono determina el tipo de efecto biológico que produce y el modo de aplicación marca su ámbito de acción en el organismo<sup>(12)</sup>. A pesar de la escasa producción científica sobre las aplicaciones terapéuticas del ozono, se confirma la existencia de una evidencia científica válida que acredita su uso como técnica terapéutica en la práctica clínica, donde diferentes investigaciones han evidenciado su carácter antimicrobiano, *razón por la que resulta de interés en el campo médico y cosmetológico.*

Como consecuencia de estos estudios, se han llevado a diferentes vías de administración (sistémica, local, autohemotransfusión, insuflación), de las cuales retomaremos las locales, donde se han estudiado que para tratamientos con crema se pueden hacer con aceites ozonificados, un ejemplo de ellos es el

producto que se estudio en Cuba (Oleozón) <sup>(10,11,12)</sup>, donde sustituyen el aceite de oliva por el aceite de girasol, realizando pruebas de mutagenicidad, toxicidad dérmica y genotoxicidad, con resultados negativos, el cual avala su empleo para diversas enfermedades como: herpes simple, piodermis, onicomycosis y otras micosis superficiales, sin que apreciaran reacciones adversas al producto, basadas en estudios pre-clínicos en animales<sup>(34)</sup>. Oleozón demostrado actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomona* y *E. coli*, siendo más susceptible la *Micobacteria*; con una actividad microbiana en un rango de MIC entre 1.18 a 9.5 mg/ml, determinada por el método de dilución en agar<sup>(35)</sup>.

Siendo este un ejemplo calve para la investigación es estadio, por que el aceite de girasol hace que el Oleozón sea un producto competitivo como agente antimicrobiano; que en comparación con el Ozonovid, aun le falta más investigaciones por hacer para que lo respalde.

## 8.0 CONCLUSIÓN

En el desarrollo de un nuevo cosmético y con el fin de registrarlo para su posterior empleo, es necesario realizar pruebas microbiológicas entre otras, que tienen como objetivo poner de manifiesto la seguridad de un producto que pueda afectar la salud del hombre.

Como consecuencia de la evaluación en el control de calidad bacteriana de la crema antiséptica Ozonovid, basada en la NOM-089-SSA 1-1994 y en la FEUM, se obtuvo que:

- ✓ Al evaluar el límite microbiano así como su esterilidad de la crema Ozonovid y el aceite de semilla de uva, se demuestra la ausencia de mesófilos aerobios, hongos filamentosos, levaduras, microorganismos patógenos y objetables, a pesar de conservarlas durante 7 meses, siendo apto para el consumo humano.
- ✓ En la prueba de preservación; basada en la capacidad de poner de manifiesto la protección del producto de una posible contaminación microbiana, denota que tiene actividad microbiana, la cual no perdura a pasar el tiempo, indicativo de que se pudiera dar en dosis pequeñas para asegurar su efectividad.
- ✓ El desafío microbiano realizado al aceite de semilla de uva, mostro que la concentración a la que está estipulada es donde empieza hacer su efecto, el cual se recomienda aumentar su concentración para asegurar su propósito como antiséptico.

- ✓ La crema Ozonovid de acuerdo a la investigación teórica acumulada en este trabajo tiene propiedades bactericidas, pues se han reportado en artículos, que el ozono daña el ácido nucleico bacterial y en un análisis estructural de tRNA mostraron que ocurre una degradación preferente de residuos de guanina. El ozono (O<sub>3</sub>) fracciona proteínas en residuos de aminoácidos y triptófano, no obstante la reacción con lípidos que ocurre en dobles enlaces carbono-carbono, presentes en ácidos grasos insaturados, produciendo diferentes productos tóxicos como peróxidos de hidrógeno, hidroperóxidos, aldehídos y ozónidos, lo cual hasta el momento se han reportado que no produce resistencia bacteriana, una gran ventaja en comparación con los antibióticos.
- ✓ Debido a que la empresas no pudo proporcionar más muestra, algunas pruebas no se realizaron por triplicado, motivo por el cual no se efectuaron más estudios, quedando abierto este trabajo a una investigación más profunda.

## 9.0 REFERENCIAS

1. Amalia Díaz Bruno/María Marcela Cruz de la concha, “*Determinación de la población bacteriana en productos fitofármacos de uso terapéutico(Cápsulas)*” (2000)
2. Bernat, Vanaclocha Vanaclocha, Salvador Cañigüeral Folcara, “*Fitoterapia*” 4ª edición (2003), Editorial Masson, Barcelona
3. NOM–089–SSA 1–1994, Bienes y servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza.
4. Bernat, Vanaclocha Vanaclocha, Salvador Cañigüeral Folcara, “*Fitoterapia*” 4ª edición (2003), Editorial Masson, Barcelona
5. Arancibia R. Leyva Y., et al “*Producción científica sobre aplicaciones terapéuticas del ozono en el web of science*”.
6. González Chamorro R. Heliodoro P., et al “*Determinación de ozono en área de ozonoterapia y fuente generadora*” Revista Cubana Salud Trabajo (2003)
7. Saldivar J. “*Terapia de ozono para tratamiento de aftas recidivantes*” (2008) V. All Rights Reserve. Reproduction or republication strictly prohibited without prior written permission.
8. <http://www.farmaciaprana.com.ar/shop/detallenot.asp>
9. Bernat, Vanaclocha Vanaclocha, Salvador Cañigüeral Folcara, “*Fitoterapia*” 4ª edición (2003), Editorial Masson, Barcelona
10. Arana I., Santrum P. Muela A. and Barcina I. “*Chlorination and ozonation of waste-water: comparative analysis of efficacy through the effect on Escherichia coli membranes*” (1999), Journal of Applied Microbiology.
11. Campos Ramírez A. Calles Fernández B. Labrada . et al. “*La ozonoterapia, una nueva opción de tratamiento en la medicina veterinaria*” Centro de Investigaciones del Ozono. Hospital Provincial de Guantánamo
12. Battoetabeña, R. Sánchez, A. Guerra J. “*Acción del aceite ozonificado sobre el proceso inflamatorio en heridas de piel de animales de experimentación*”(2002) Facultad de Ciencias Médicas, Mariana Grajales Coello, Holguín. Correo Científico Médico e Holguín

13. Falcon Lincheya, L Menendez Cepero S., Simón R.D., Garbayo Otoño E. Moya Duque S. and Abreu García M. “*Aceite ozonizado en dermatología experiencia en 9 años*” (1998), Revista CENIC Ciencia Biológicas.
14. <http://www.ozonikbio3.com/aceites.html>
15. <http://www.genecellmexico.com.mx>
16. <http://www.ozonoterapiatenerife.com/efecto.htm>
17. Israel Hernández Valdepeña, “*Diseño y evaluación de un sistema cosmético a base de fosfolípidos*”(1997) FESC.
18. Clavo B. Pérez JL, López Suárez G. y cols “*Effect of ozone therapy on muscle oxigenation*” Journal of Alternative and Complementary Medicine, (2003).
19. Andreaula CF, Simonetti Desantis F. y Cols. “*Minimall invasive oxygen-ozone therapy for lumbar disk herniation* “ Am J. Neurorafiol (2003)
20. Alvarez R. Menendez, S. Peguera M. and Turrent J. “*Treatment of primary pioderma with ozonized sunflower oil.*” (1997). National Center for Scientific Research. Havana, Cuba. In Second International Symposium on Ozone Application, Havana, Cuba, March.
21. <http://www.atl-gestion.com/Asepsia%20y%20desinfeccion,htm>
22. Geo F. Brooks, Janet S. Butel, Stephen, A. Morse. “*Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*”(2005),18ª edición, editorial Manual moderno, México D.F.
23. Lennette Edwin H., Spaulding truant, “*Manual of clinical microbiology*” (1975), 2ª edición, American Society for Microbiology, Washington D.C.
24. [Http://www.solociencia.com/biologia/microbiologia=técnicas.htm](http://www.solociencia.com/biologia/microbiologia=técnicas.htm)
25. Stephen J. McPhee, MD, Vishmanath R., William F. Ganong, Jack D. Lange, MD, “*Fisiopatología médica: una introducción a la medicina clínica*” (2001), 3ª edición, Editorial El manual moderno, México D.F.
26. Stephen J. Mc. Phee, MD, Viswanath R. William F. Ganong, et al.”*Fisiopatología médica, una introducción a la medicina clínica*” 3ª edición (2001), Ed. El manual moderno, México, D.F.
27. Prescott Lansing M. Harley J., Klein H. “*Microbiología*” (2000), 4ª edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana, Madrid España.

28. Tay Zavala Jorge. “*Microbiología y Parasitología médica*” (2003), 3ª edición, Méndez Editores, México.
  29. Robert K. Murray, Peter A. Mayes, Daryl K. Granner, Victor W. Raday”*Bioquímica de Harper-ilustrada*” 16ª edición, (2004) Editorial Manual moderno, México D.F.
  30. Ausina Ruíz Vicente, Moren Guillén S. “*Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*” (2006) Ed. Médica Paramericana, Madrid España
  31. Secretaría de salud, comisión permanente FEUM (farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos), (2004), 8ª edición, Vol. I
  32. Mensoza S. “*Comparison of three biological assays for the detection of toxigenic properties of Bordetella bronchiseptica associated with atrophic rhinitis*” (1993) Vet. Microbiol 36: 215-219
  33. “*Técnicas de análisis microbiológico*” Vol.1 2a Edición, Editorial Acribia, Zaragoza (España)
  34. 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*” H.J.D. and Deans, S.G. (2000).
- Lezcano I. Nuñez N. Gtierrez M. Molerio, J. Regeiferos, M. G. and D “*Actividad in vitro del aceite de girasol ozonizado (oleozon) frente a diferentes especies bacterianas*”.Revista CENIC Ciencias Biológicas

Números de tubos positivos		Tubos inoculados	3 con 10 ml de la muestra
			3 con 1 ml de la muestra
			3 con 0.1 ml de la muestra
3 (dil 10 <sup>-1</sup> )	3 (dil 10 <sup>-2</sup> )	3 (dil 10 <sup>-3</sup> )	Número más probable (NMP)
(10 ml)	(1 ml)	(0.1 ml)	
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	3	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100

Tabla No. 9 Características morfológicas y bioquímicas

<u>Bacteria</u>	<u>Medio de cultivo</u>	<u>Morfología colonial</u>	<u>Morfología microscópica y reacción al Gram</u>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sales y manitol	Colonias amarillas doradas rodeadas de una zona amarilla	Cocos Gram positivos agrupados en racimos
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Cetrimida	Colonias verdosas	Bacilos Gram positivos
<i>Escherichia coli</i>	Mc Conkey	Colonias rosas con precipitado rojo (Lactosa (+))	Bacilos Gram negativos

Tabla No.10 Pruebas bioquímicas para diferenciación de bacterias

<u>Bacteria</u>	<u>Indol</u>	<u>MR</u>	<u>VP</u>	<u>Citrato</u>	<u>Coagulasa</u>	<u>Catalasa</u>	<u>Oxidasa</u>	<u>Motilidad</u>	<u>Manitol</u>	<u>OF</u>
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA	-	+	-	+	+	NA	-	+	F
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	-	-	-	+	NA	+	+	+	NA	O
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	NA	+	+	+	NA	F

NA = No aplica

## **ANEXO B (MATERIAL Y EQUIPO)**

### **B.1 Material**

- ✓ Matraces Erlenmeyer de 500 ml y 100 ml
- ✓ Pipetas volumétricas de 1 ml, 2 ml
- ✓ Pipeta graduadas de 1 ml, 5 ml, 10 ml
- ✓ Micropipeta de 5  $\mu$ l, 200  $\mu$ l
- ✓ Puntas para la micropipeta
- ✓ Probeta de 100 ml
- ✓ Cajas de petri de 20 x 100 mm
- ✓ Tubos de ensayo 16 x 150 mm
- ✓ Botellas de 100 ml para dilución con tapón de rosca
- ✓ Marcador
- ✓ Masking tape
- ✓ Gasa y algodón
- ✓ Espátulas
- ✓ Asa
- ✓ Mechero
- ✓ Tubo de nefelómetro de 0.5 de Mac Farland

### **B.2 Equipo**

- ✓ Estufa a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$
- ✓ Refrigerador
- ✓ Balanza analítica y granataria
- ✓ Autoclave
- ✓ Horno para esterilizar
- ✓ Recipiente para material contaminado
- ✓ Microscopio
- ✓ Baño maría
- ✓ Espectrofotómetro

### **B.3**      Reactivos y medios de cultivo

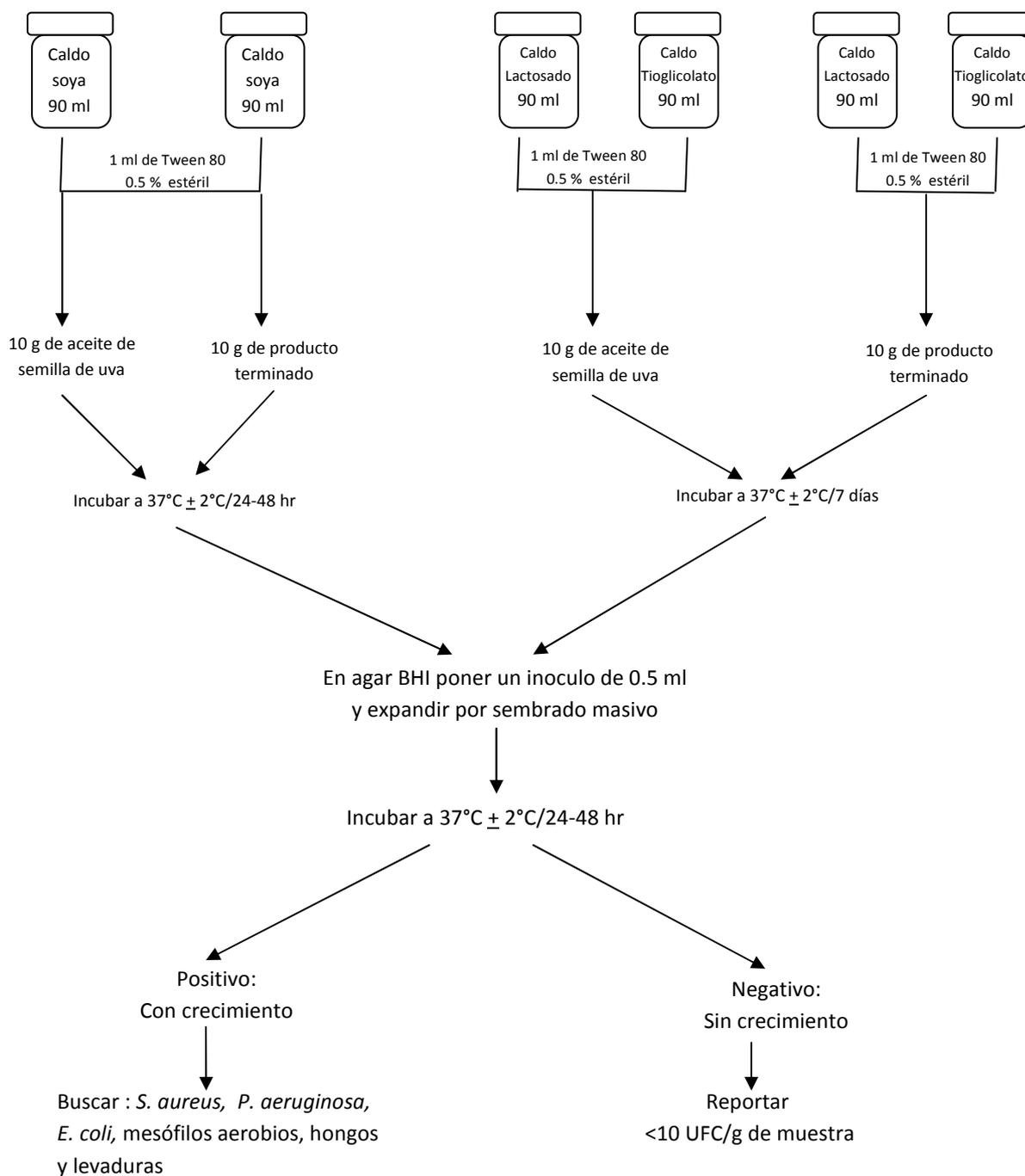
- ✓ Tween 80 (0.5 %)
- ✓ Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)
- ✓ Hielo
- ✓ Etanol al 70% (v/v)
- ✓ Medio Leetheen (CL)
- ✓ Caldo tioglicolato (CT)
- ✓ Caldo soya tripticaseina (CST)
- ✓ Caldo leetheen (CL)
- ✓ Caldo lactosado rojo de fenol
- ✓ Caldo lactosado rojo de fenol
- ✓ Caldo bilis verde brillante
- ✓ Agar infusión cerebro corazón(BHI)
- ✓ Agar Letthen
- ✓ Agar cuenta estándar (ACS)
- ✓ Agar Mc Conkey (MC)
- ✓ Agar cetrimida

### **B.4**      Cepas de referencia

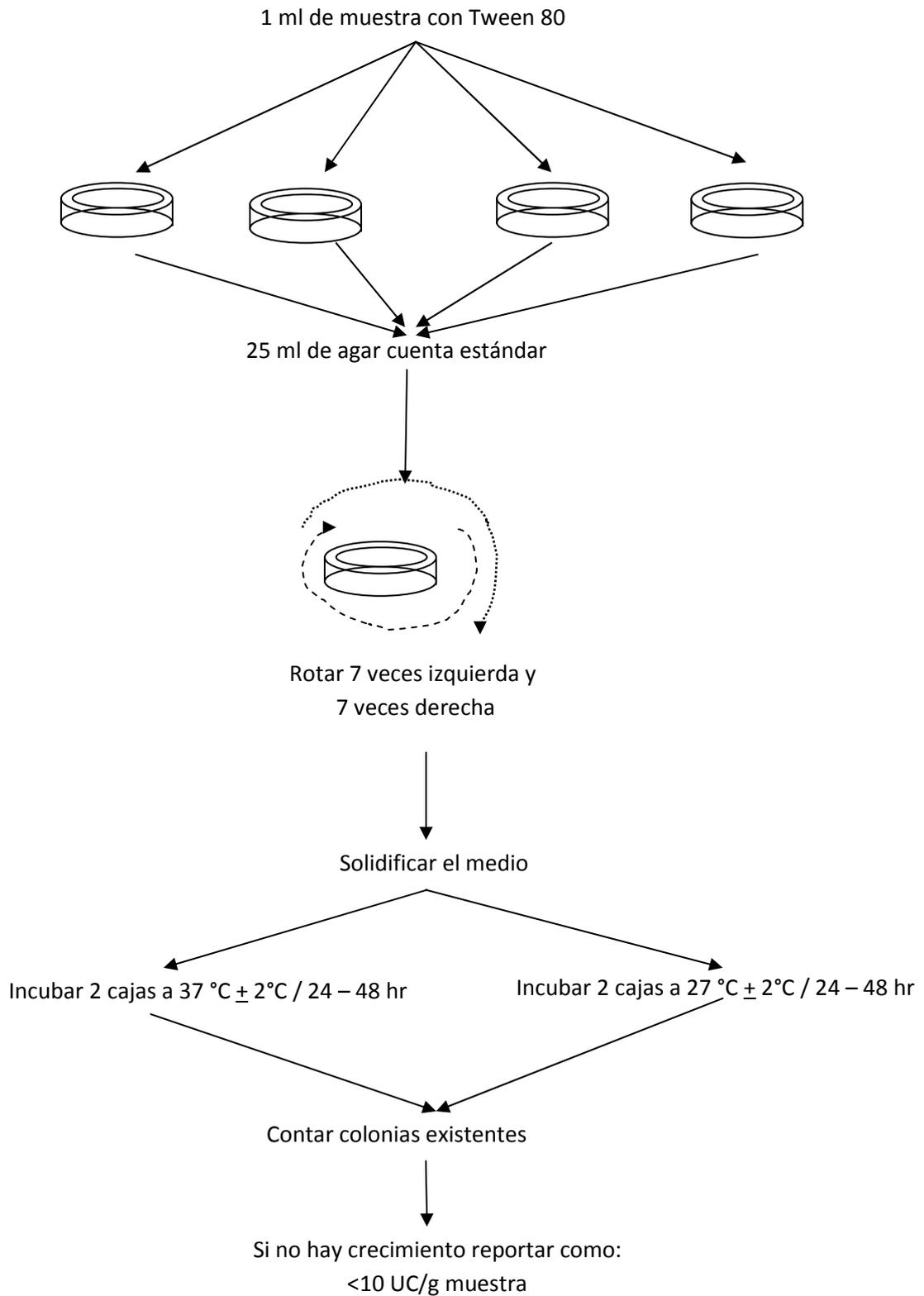
- ✓ *Candida albicans* (ATCC 10231)
- ✓ *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)
- ✓ *Escherichia coli* (ATCC 10536)
- ✓ *Salmonella typhimurium* (LNA 99)
- ✓ *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 15442)

## ANEXO C (MÉTODOS EN DIAGRAMAS DE FLUJO)

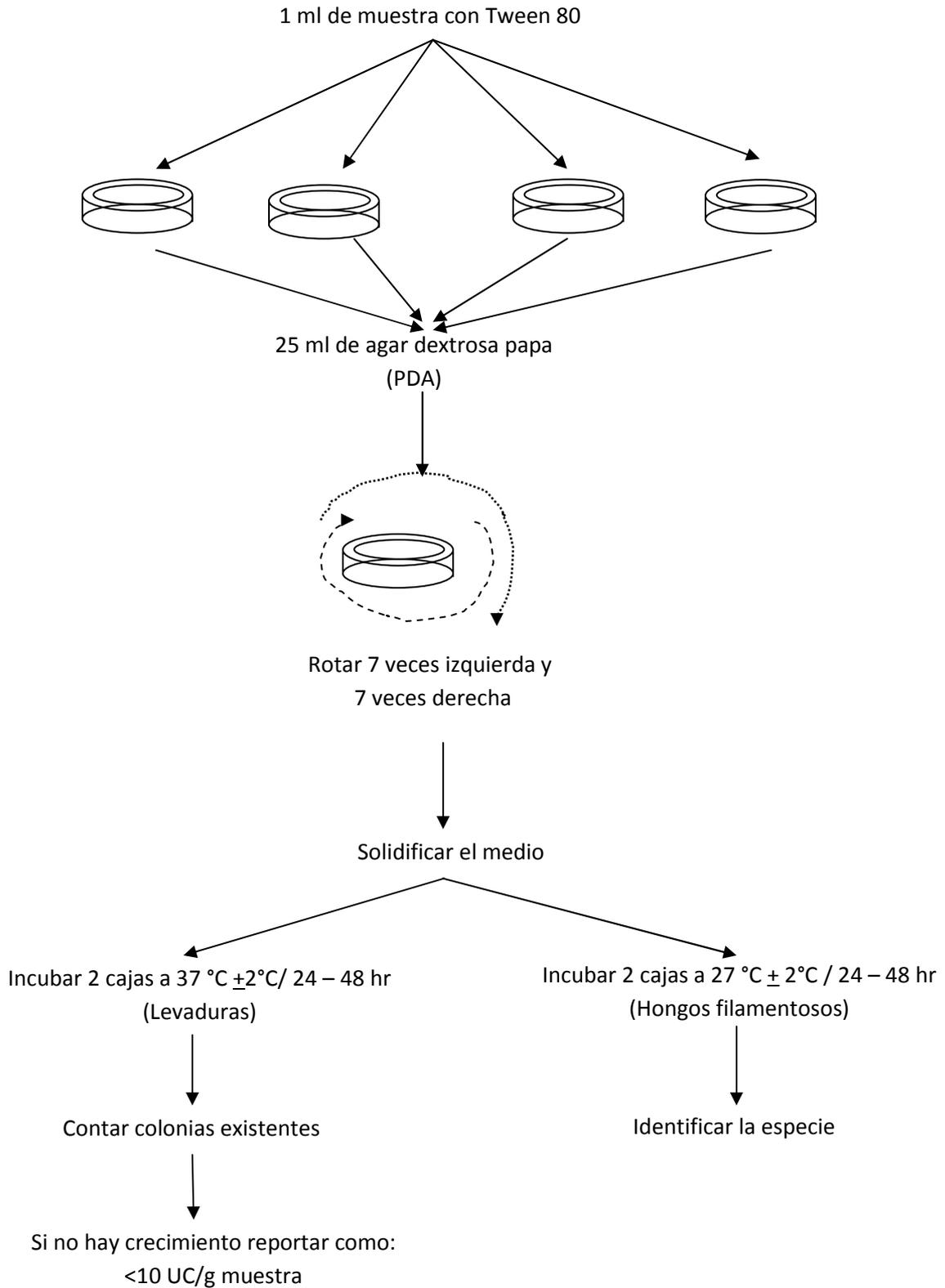
### C- 1 Prueba de esterilidad



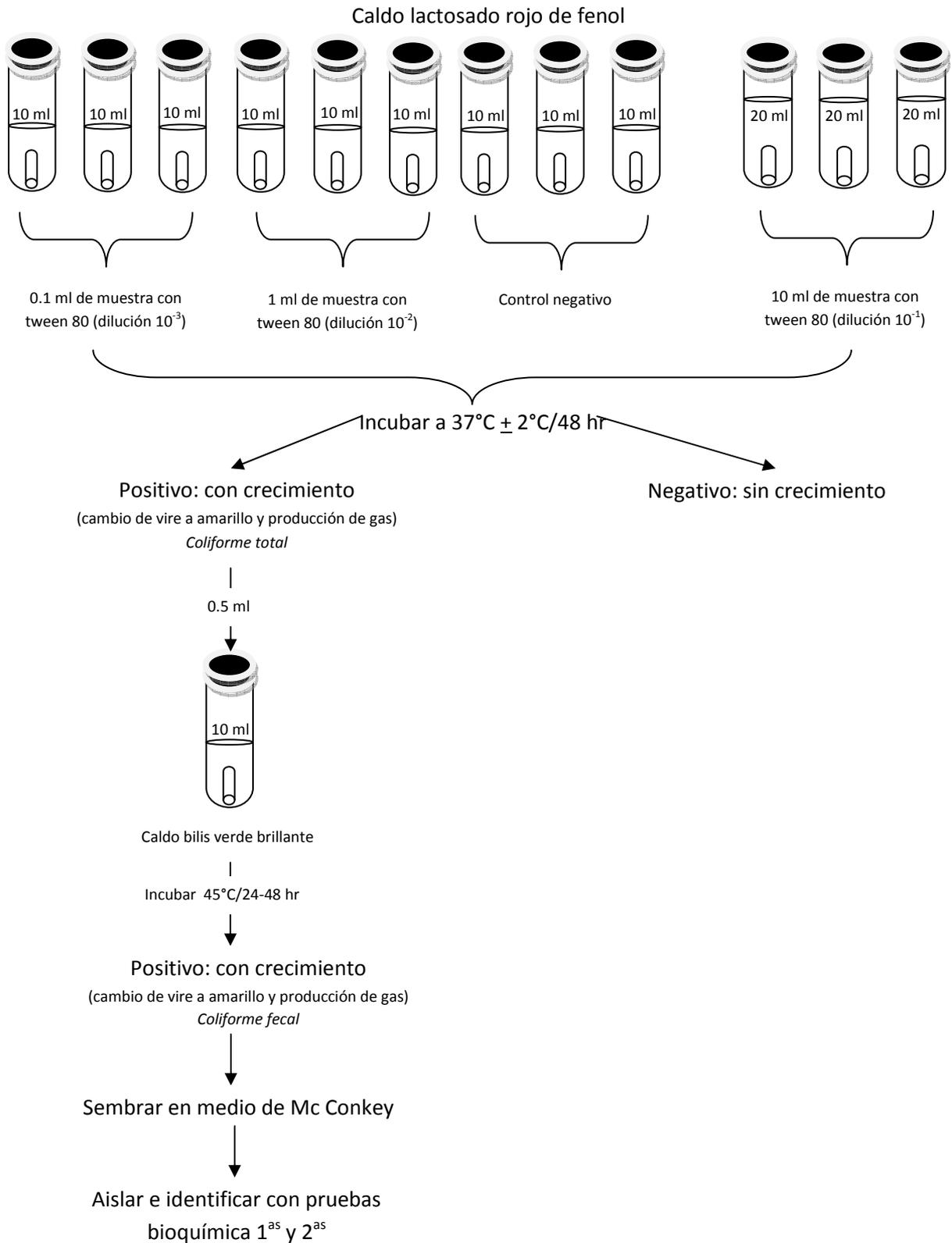
C- 2 Cuenta total de mesófilos (vaciado en placa)



C- 3 Cuenta de hongos filamentosos y levaduras

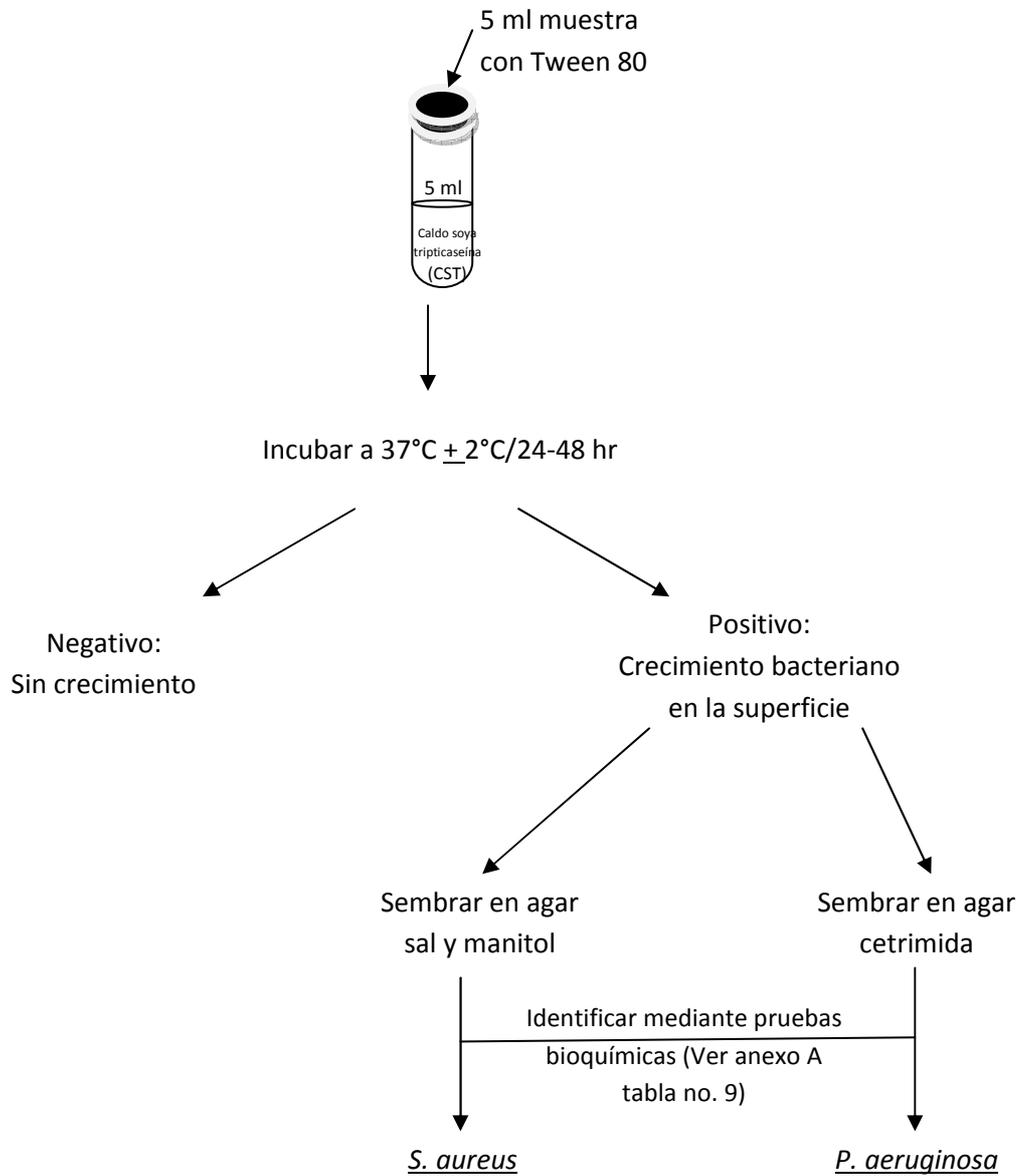


## C-4 Número mas probable (NMP)

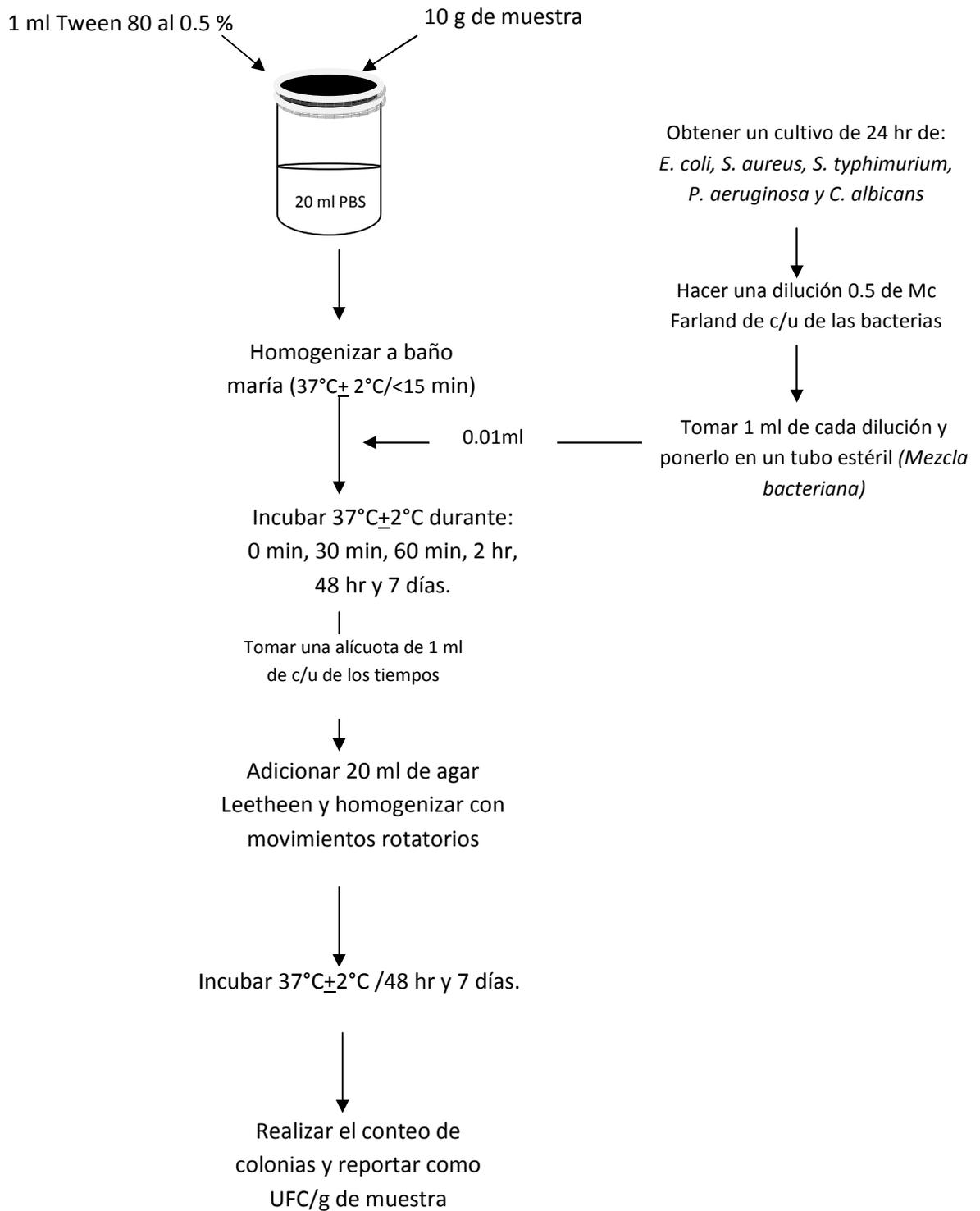


Nota: el NMP se determina de acuerdo al número de tubos positivo como se muestra en la tabla no.8 del anexo A

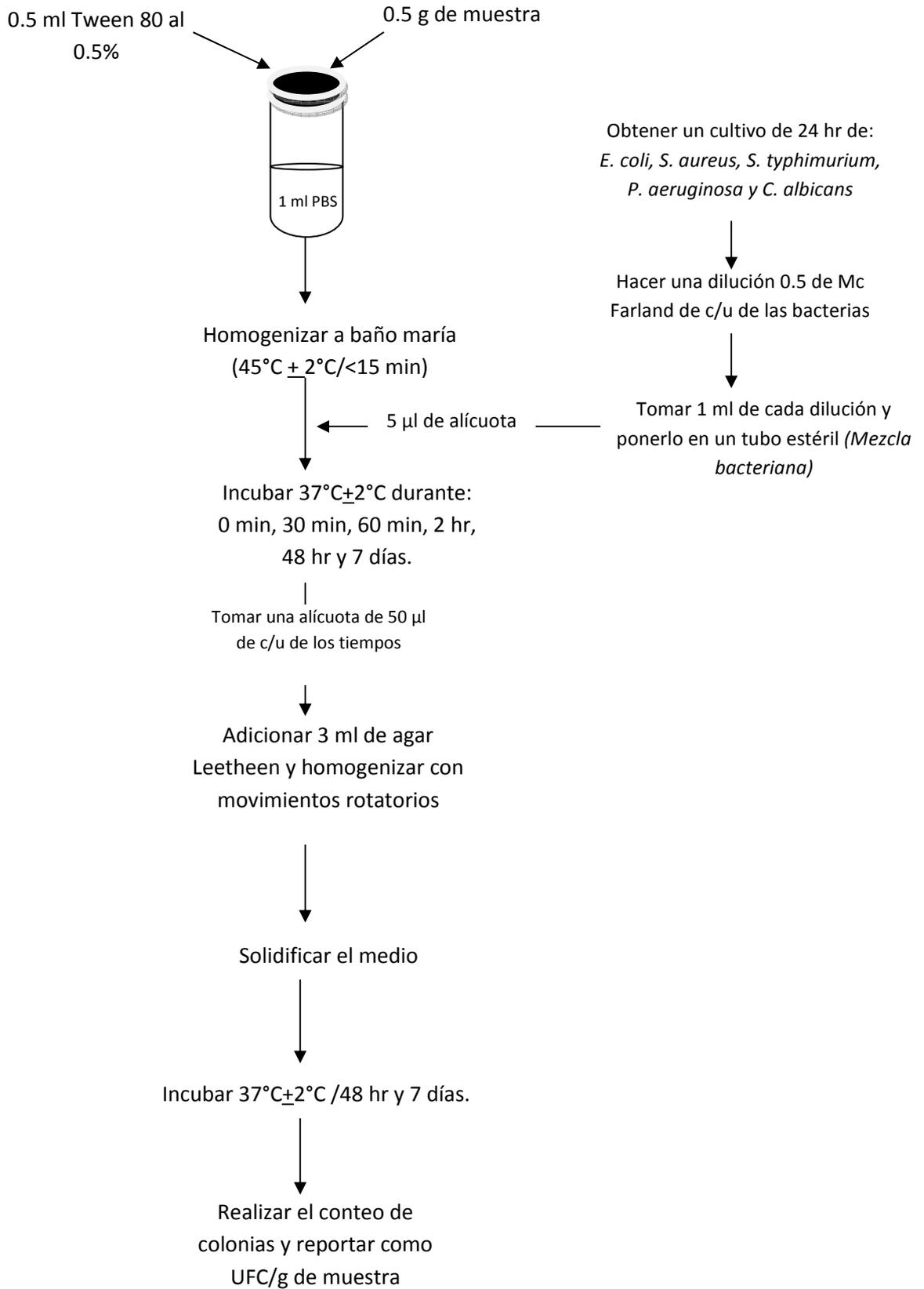
C-5 Determinación de Pseudomona aeruginosa y Staphylococcus aureus



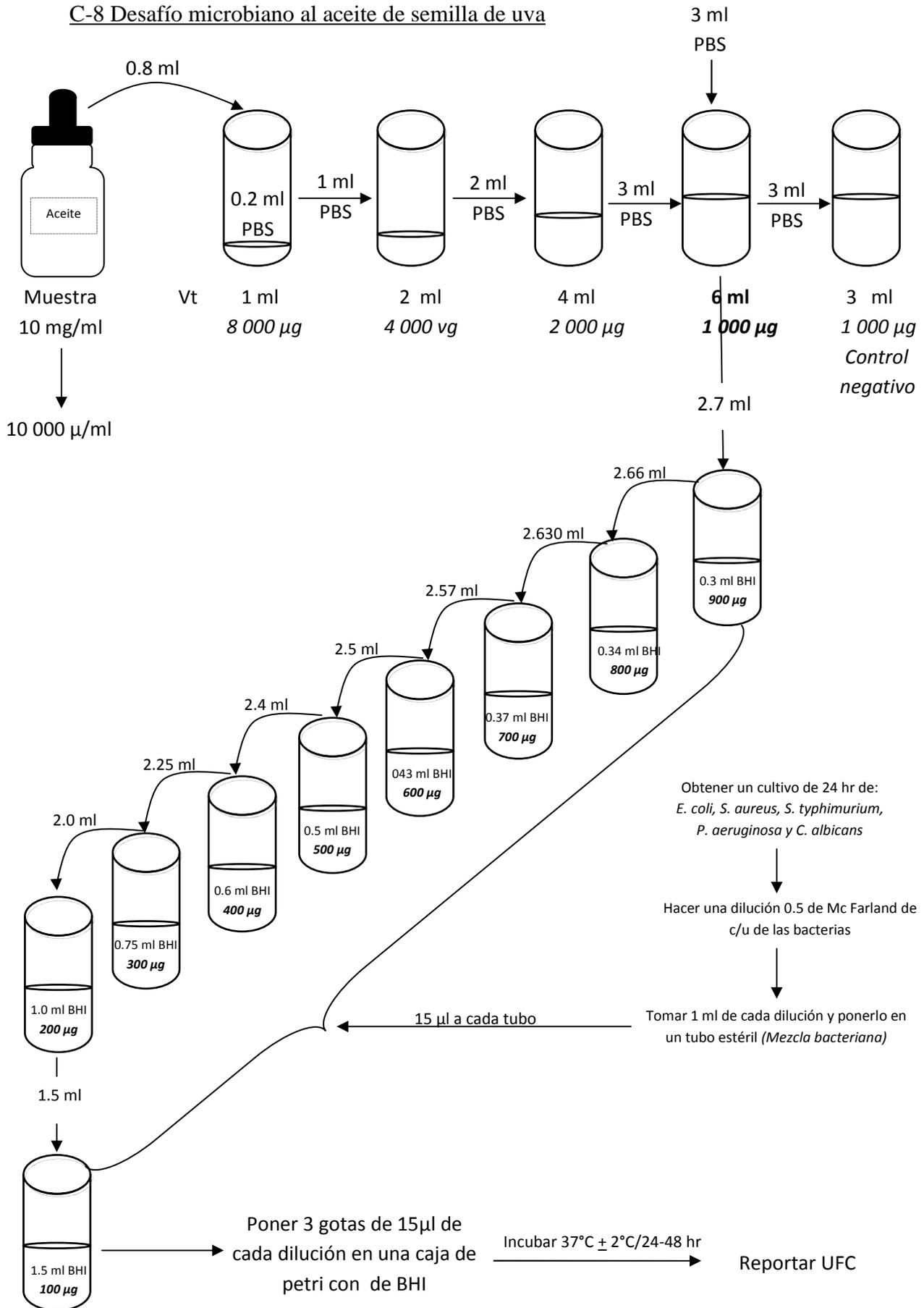
C-6 Efectividad del preservativo antimicrobiano a la crema semisólida



C-7 Efectividad del preservativo antimicrobiano al aceite de semilla de uva



C-8 Desafío microbiano al aceite de semilla de uva



## Abreviaturas

NOM	Norma Oficial Mexicana
NMP	Número más probable
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
MIC	Mínima Concentración Inhibitoria
UFC	Unidad Formadora de Colonias
ATTC	Colección de cultivos tipo americano (American Type Culture Collection)
ATP	Adenosin trifosfato
DPG	2,3-difosfoglicérato
NADPH	Adenin nicotinamida dinucleotido fosfato reducido
NADP	Adenin nictotinamida dinucleotido fosfato oxidado
GSH	Glutación reducido
GSSH	Glutación oxidado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
TSST	Toxina del síndrome del shock tóxico
Fc	Fracción cristalizable
Ig G	Inmunoglobulina G
BHI	Agar Infusión Cerebro Corazón
PDA	Agar papa dextrosa
CST	Caldo Soya Trypticaseína
PBS	Buffer de fosfatos
O <sub>2</sub>	Oxígeno
O <sub>3</sub>	Ozono
μl	Microlitros
μg	Microgramos
g	Gramos
hr	Horas

Lt	Litro
ml	Mililitros
Seg	Segundo
°C	Grados centígrados ó grados Celcius