

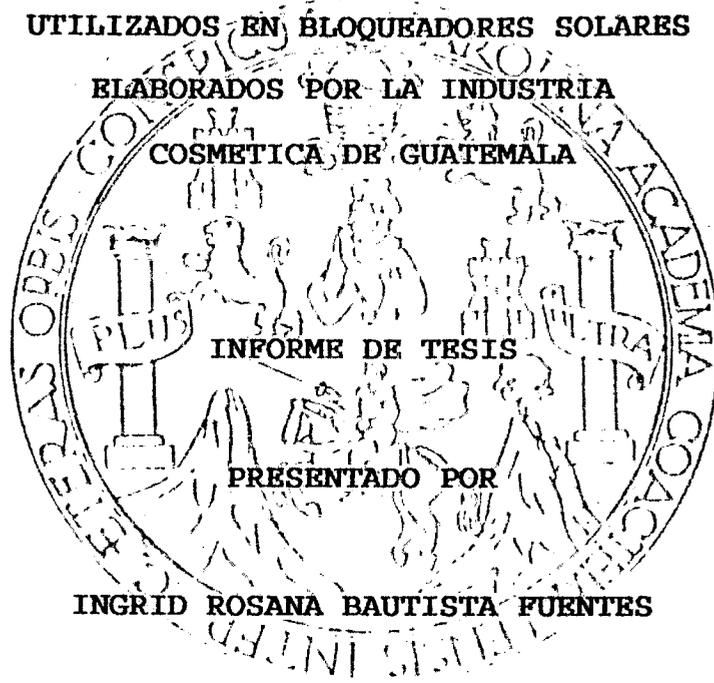
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

EFFECTIVIDAD DE PRESERVANTES ANTIMICROBIANOS

UTILIZADOS EN BLOQUEADORES SOLARES

ELABORADOS POR LA INDUSTRIA

COSMETICA DE GUATEMALA



INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR

INGRID ROSANA BAUTISTA FUENTES

PARA OPTAR EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA

GUATEMALA, JULIO DE 1, 996.

D.2
06
T (173)

**JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANO	Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
Secretaria	Licda. Ana Fortuny de Armas
Vocal I	Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez
Vocal II	Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Vocal III	Lic. Rodrigo Herrera San José
Vocal IV	Br. Ana María Rodas Cardona
Vocal V	Br. Hayro Oswaldo Garcia García

TESIS QUE DEDICO

A DIOS Y LA VIRGEN MARIA: Por su bendita bondad, y por permitirme finalizar esta etapa.

A MIS PADRES: Héctor Alfonso Bautista Ramirez,
Amable Marcela Fuentes de Bautista
Por su amor, apoyo y por ser
piedra angular, para poder
alcanzar una de mis mayores metas.

A MIS HERMANOS: Carlos, Magnolia, Ardany y Normy
por el apoyo y cariño que me han
brindado.

A MIS SOBRINAS: Rosita y Maria Fernanda

A LAS FAMILIAS: Quiroa Peralta, Barrios Cifuentes,
por su ayuda incondicional,
durante desarrollo de mi carrera.

AL SACERDOTE: Fray Francisco Paulino Velázquez.

A MIS AMIGOS: Rocio, Rosa Maria, Brenda, Ana
Beatriz, Claudia Karina, Nydia,
Yara, Sandra, María Regina, Ruth,
Claudia Verónica, Lyly Astrid,
Yohana, Edgar, Julio, Ricardo,
Sergio, en especial a Byron René.
Con los que he compartido grandes
experiencias y cada uno ocupa un
lugar especial

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Licenciado Estuardo Serrano Vives, por la ayuda prestada en la elaboración de está tesis.

Y agradecimiento de igual manera a la gerencia de Laboratorios LAMFER, por su comprensión y apoyo.

I N D I C E

1.	Resumen.....	1
2.	Introducción.....	3
3.	Antecedentes.....	5
4.	Justificaciones.....	17
5.	Objetivos.....	18
6.	Hipótesis.....	19
7.	Materiales y Métodos.....	20
8.	Resultados.....	26
9.	Discusión de resultados.....	27
10.	Conclusiones.....	30
11.	Recomendaciones.....	31
12.	Referencias.....	32
13.	Anexos.....	35

1. RESUMEN

Este trabajo fue elaborado de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP XXIII) para verificar la calidad a nivel microbiológico como la actividad antimicrobiana de los preservantes utilizados en los bloqueadores solares que se elaboran en Guatemala.

Para ello se seleccionaron, mediante muestreo aleatorio los establecimientos donde se obtuvieron por conveniencia un total de 15 muestras provenientes de cinco laboratorios nacionales que elaboran dichos productos, las cuales se sometieron a un conteo inicial de microorganismos por el método en placa para aerobios (USP XXIII), para descartar las muestras que tuvieran conteo arriba de 1000 UFC/g. De acuerdo a lo anterior, fue descartada una muestra (6.67%) y en las 14 muestras restantes (93.33%) se evaluó la actividad antimicrobiana de los preservantes. Para ello se inoculó cinco cepas ATCC (Cándida albicans, Escherichia coli, Aspergillus niger, Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus), a cada muestra, en concentraciones mayores de 10 ufc/g (unidades formadoras de colonias por gramo de muestra), determinando la concentración de microorganismos a los 7, 14, 21, y 28 días de inoculada la muestra, obteniendo en todos los casos recuentos menores de 100 ufc/g de muestra.

Al analizar los recuentos se puso de manifiesto la efectividad de los preservantes utilizados, concluyéndose que

el 80% de los laboratorios fabricantes en estudio, incluyen en la formulación de sus productos, preservantes eficaces para el control de los microorganismos.

2. INTRODUCCION

En el mercado nacional, existen diferentes productos de tocador, entre ellos se encuentran los bloqueadores solares (SPF mayor de 15). los cuales en la actualidad han tenido demanda por su acción de protección al usuario contra los rayos ultravioleta que no son filtrados a causa de la destrucción de la capa de ozono, para lo cual deben cumplir con los requisitos específicos de calidad, para este tipo particular de productos.

En Guatemala, actualmente no existen normas oficiales para los bloqueadores solares en cuanto al análisis microbiológico, que permitan evaluar la eficacia de los preservantes antimicrobianos, lo que hace necesario la realización de estudios para comprobar la eficacia de estos y así garantizar la calidad microbiológica del producto, debido a que la presencia de microorganismos como: Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Cándida albicans y Aspergillus niger, además de tener la capacidad de producir cambios químicos y físicos al producto, pueden ocasionar en el consumidor lesiones oculares, dermatitis, conjuntivitis, pústulas, etc.

En este estudio se determino por métodos microbiológicos, la eficacia de los preservantes antimicrobianos utilizados en la manufactura de los

bloqueadores solares, y en los casos en los que hubo contaminación, inferir las posibles causas que provocan la ineficacia del preservante.

Debido a la complejidad de dichos productos se analizaron bloqueadores solares de cinco diferentes marcas comerciales que son manufacturados y distribuidos por la industria cosmética guatemalteca y que se encuentran registrados en la Dirección General de Servicios de Salud; para ello se tomaron tres muestras de cada uno de los cinco laboratorios. La metodología a usar consistió, en realizar un recuento aeróbico total de cada una de las muestras para determinar el conteo inicial de bacterias, mohos y levaduras, y de esta manera excluir las muestras fuera de las especificaciones.

La eficacia de los preservantes antimicrobianos, se evaluó inoculando las muestras con microorganismos patógenos durante un período de incubación de 7, 14, 21, 28 días, realizándoles un recuento del número de microorganismos por mililitro de muestra (ufc/ml), a través del método de vaciado en placa.

3. ANTECEDENTES

De acuerdo a la bibliografía consultada, se puede constatar que existe poca información disponible en el medio sobre bloqueadores solares y no hay en ninguno que evalúe específicamente la efectividad en los preservantes utilizados en estos productos, por lo que a continuación se presentan algunos estudios encontrados:

Fisher, 1941 puntualiza que las emulsiones no iónicas reaccionan con ciertos productos químicos particularmente fenóles. (1)

Bolle y Mirimanoff reportan en 1,950 que el ácido phidroxibenzóico y otros preservantes ampliamente usados, son inactivados por emulsificantes no iónicos.

De Navarre estuvo experimentando para confirmar la inactivación del ácido P-hidroxibenzóico en emulsiones no iónicas; donde el 95% del propil paraben es inactivado por algunos no-iónicos como el oleato de sorbitan polioxietileno (Tween 80), mientras que el metil paraben es inactivado en un 80%.

Barr y Tice, acordaron que el ácido sórbico, las sales del fenilmercurio y el cloruro de benzalconio son preservantes convenientes para productos conteniendo emulsificantes no iónicos. (1)

En 1,977 se llevó a cabo un congreso de los miembros de la sociedad de Químicos Cosmetólogos de México, en el cual se discutieron las causas y las consecuencias de la contaminación microbiana en cosméticos, así como los métodos aconsejados por la USP para la determinación de esta contaminación, los cuales son el método de vaciado en placa y el método de tubo múltiple. (2,3)

En Guatemala las investigaciones disponibles sobre el tema, son las realizadas por:

Calderón E. en 1,963 realizó el trabajo de tesis "Bacteriostáticos. Importancia de su empleo en la industria farmacéutica y cosmética". en el cual define, describe y clasifica los preservantes. (4)

Oliva de Vargas VS, en 1,965 realizó el trabajo de tesis, "Evaluación de los champús que se comercializan en Guatemala". en el se evalúa la calidad de los champus en Guatemala, además define un champú y un preservante. (5)

Milian C. Marco, en 1,975 en su trabajo de tesis "Diseño y funcionamiento de un sistema de control de calidad microbiológica para una planta de cosméticos", indica la importancia que tiene el establecer un laboratorio microbiológico y sus características ideales dentro de la industria, señala la influencia de los microorganismos en la manufactura y almacenamiento de los cosméticos y resalta la ventaja económica cuantificable que conlleva instalar un control microbiológico.

Básicamente el Ing. Milian, hace referencia a la consecuencia más importante que es la contaminación del producto, lo cual origina en el cosmético algunos defectos; como son el mal olor en el preparado, coloraciones verdes o grisáceas que le dan mal aspecto al producto. La acción de los microorganismos en la elaboración de los cosméticos debe tenerse en cuenta por las siguientes razones: las enfermedades de la piel en su mayoría son ocasionadas por microorganismos, los malos olores corporales también son causados por microorganismos, se debe tener en cuenta que las preparaciones cosméticas pueden dañarse en la etapa final de preparación, por bacterias, virus, levaduras y hongos, si ha estos no se les adicionan preservantes que tiendan a inhibir el crecimiento de los microorganismos. (6)

Sánchez Maria M. en 1,981 realizó el trabajo de tesis "Microbiología en cosméticos", en el cual presenta un análisis microbiológico, según las recomendaciones de la Food and Drug Administration (F.D.A.) y de la Cosmetics, toilet and Food Administration (C.T.F.A.) en 460 cosméticos, los cuales fueron elaborados en Guatemala, tanto por laboratorios nacionales como extranjeros que funcionan en el País (7).

Mulberry Gayle K, en 1,987 realizó en estudio "Tiempo de reducción decimal", que consistió en el tiempo requerido para la ..inactivación del 90% de microorganismos expuestos al producto en estudio, dentro de las desventajas presenta, que

la evaluación de la eficacia de los preservantes antimicrobianos no puede hacerse cuantitativamente, además hace mención de otros dos métodos, el test denominado "Reto y muerte rápida" y el test "Acelerado para preservantes", estos tres métodos constituyen una modificación del método original "Efectividad de preservantes antimicrobianos de la farmacopea de los Estados Unidos" (USP XXII). (7)

Chang ME, en 1,989 realizó el estudio de tesis "Comparación de la efectividad antimicrobiana de dos métodos de sanitización en el equipo principal de procesos y envasados en la industria cosmética", en él compara los métodos de vapor saturado y de sanitizantes químicos, usando la técnica de Swab test, siendo el método de vapor saturado el de mejores resultados (8)

Cordón Rosa M. en 1.990 realizó el trabajo de tesis "Evaluación de la efectividad de preservantes antimicrobianos en champú de bebé fabricados en Guatemala", en el cual analizó 24 muestras de un total de 30, las cuales se encontraron dentro de las especificaciones con respecto a su contenido microbiano utilizando la técnica descrita por la farmacopéa de los Estado Unidos de América XVII, obteniendo que para la mayoría de muestras los preservantes fueron efectivos, no encontrando ninguna muestra donde el preservante fuera inefectivo para los cinco microorganismos. (9)

Muñoz J., en 1990 en su estudio de tesis "Evaluación de la eficacia de preservantes químicos utilizados en lociones para manos elaboradas en Guatemala", en dicho estudio incluye las características de un preservante ideal, concluyendo que el sistema de preservantes utilizados en lociones para manos es eficaz, ya que inhibe significativamente el crecimiento de estos microorganismos. (10)

Alas Gordillo, en 1990 en su estudio de tesis "Eficacia de preservantes antimicrobianos en champú", determinó por métodos microbiológicos, la eficacia de los preservantes antimicrobianos, utilizados en la manufactura de champú, obteniendo que de un total de 30 muestras analizadas .. 10 resultaron fuera de los límites microbianos establecidos por la Farmacopea Americana, incluyendo en dicho estudio productos elaborados tanto por laboratorios nacionales como transnacionales. (11)

Aunque los rayos solares son necesarios para la síntesis de vitamina D3 en la piel y estos son usados terapéuticamente (fototerapia) en ictericia neonatal, psoriasis y desórdenes relacionados con pápulas, los rayos solares van produciendo efectos adversos agudos sobre la piel (quemaduras, y en asociación con drogas inducen a la fototoxicidad aguda). Estos aumentan los efectos adversos crónicos sobre la piel (por ejemplo son la elastosis actínica, keratosis actínica premaligna, carcinoma de células escamosas, formación de

catarata nuclear, alteración del sistema inmune causando incompetencia selectiva inmune de la piel) (Pathak 1,987; Concilio sobre asuntos científicos, 1,989). Aunque la piel tiene defensas naturales contra la radiación ultravioleta (UVR) (por ejemplo, la presencia de Keratina, melanina, betacaroteno, ácido urónico y la enzima reactiva alimentadora de oxígeno dismutasa peróxido y reductasa glutatión peroxidasa), las medidas profilácticas son recomendadas para todos los grupos de edad, particularmente infantes y niños, para limitar la exposición a los rayos ultravioleta (UVR) y así minimizar la duración del impacto (Pathak 1,987).

Algunas medidas incluyen el uso de ropa protectora como también de productos protectores y bloqueadores químicos y físicos.

La radiación solar consiste en rayos ultravioleta (6%), visible (48%), e infrarrojos (46%); la radiación ultravioleta es la más distante y se subdivide en tres categorías: (1) UVA o ultravioleta cercana, 320 a 400 nm; (2) UVB o ultravioleta media, 290 a 320 nm; y (3) UVC o ultravioleta lejana, 200 a 290 nm. La radiación UVC es filtrada por la capa de ozono en la estratosfera y no penetra en la superficie terrestre, no ocurre apreciable pigmentación con la radiación solar UVC, sin embargo el potencial de acción eritemotógeno de la radiación UVC es mayor que de la radiación UVB. La radiación UVC puede ser emitida por medios artificiales, siendo un germicida débil.

A nivel del mar, durante los meses de verano, la radiación solar ultravioleta UVB o ultravioleta media es alrededor de 0.5% y de UVA o ultravioleta cercana de 6.3%. Aproximadamente el 90% del total de rayos ultravioleta (UVR) es UVA, pero los rayos UVB son de 800 a 1000 veces más eritematógenos y melanogénicos que los rayos UVA. La variación estacional ocurre entre junio y diciembre, siendo la intensidad de radiación UVA (doble) y la UVB (decuple), generalmente se acepta que la radiación UVA cuenta con alrededor de 1/6 del total potencial de eritematosis y melanosis de la radiación ultravioleta, sin embargo la UVA puede también, causar efectos adversos de radiación y es sabido que puede agravar los efectos de la radiación UVB induciendo carcinogénesis en la piel, y es el espectro principal de rayos responsables de la reacción de drogas fototóxicas. Desafortunadamente los cosméticos químicos aceptados, protectores solares, son menos efectivos contra la radiación UVA, pero las investigaciones han desarrollado protectores solares de amplio espectro que están en camino; y los resultados preliminares son estimulantes (Gange et al, 1,986).

La sensibilidad al sol y la habilidad para producir pigmentación varía en la totalidad de individuos. Por lo que la piel ha sido clasificada en seis tipos (Table # 1). Esta clasificación es en base a los primeros 45 a 60 minutos del

medio día expuestos al sol del verano, después de la no exposición al sol durante la estación de invierno, los individuos de piel clara con piel normal requirieron solamente de 10 a 20 minutos de exposición a los rayos solares, para desarrollar susceptibilidad al quemado (dosis mínima para eritema MED).

La FDA ha aprobado alrededor de 25 compuestos químicos para ser usados en protectores y bloqueadores solares, estos incluyen el ácido para-aminobenzóico (PABA) y sus esterres, benzofenonas, cinamatos y derivados del salicilato, cuyo espectro de absorción es esencialmente limitado a las bandas de radiación UVB (260-320), sólo algunas benzofenonas y .. derivados del cinamato tienen un espectro de absorción que cubre la radiación UVB y una parte de las bandas de radiación UVA (270-360). El compuesto químico 4-terbutíl-4-metoxidibenzoílmolanol (Parsol, 1,987), predominantemente absorbe en las bandas de radiación UVA (Gange, et al 1,986; Pathak, 1987; Lowe et al. 1,988), recientemente este fue combinado con el padimato en una formulación veterinaria, la cual absorbe entre 260- 380 nm sin embargo éste no ha sido admitido como cosmético.

Los protectores solares físicos, (óxido de zinc, caolín, dióxido de titanio) dispersan o disipan la radiación ultravioleta y visible y así son opacados todos los rayos de onda larga. Estos agentes son ocasionalmente referidos como

bloqueadores solares porque ofrecen protección desde el espectro de radiación ultravioleta y visible. Son especialmente usados para proteger seleccionadas partes del cuerpo (ejemplo nariz, mejillas y hombros) pero son cosméticos no admitidos por su color y arenosidad.

Los protectores solares químicos son ahora clasificados con un factor de protección solar (SPF) este rango va de 2 a 30 o más, del número 2 al 15 son considerados bronceadores y del 15 en adelante bloqueadores solares. Este factor es definido como el radio de la dosis total de energía ultravioleta requerida para producir una dosis mínima de eritema (MED). El protector solar es utilizado totalmente para producir alguna reacción exterior. El test del factor de protección solar es basado solamente sobre la radiación UVB, no de la radiación UVA. (Lowe et al, 1988 B). Cinco categorías de productos están basados en número de factores de protección solar SPF; SPF de 2-4 protección mínima de quemado, permite el bronceado; SPF de 4-6 protección moderada, permite el bronceado; SPF de 6-8 extra protección para la quemada, permite un bronceado limitado; SPF de 8-15 máxima protección de quemado, también permite un bronceado limitado; SPF arriba de 15, total protección de quemado y no permite el bronceado. Los valores de SPF arriba de 15 son raramente necesarios, las autoridades ponen un límite de 15 para minimizar la sobre exposición a los agentes químicos en las formulaciones y porque éstos valores proporcionan

suficiente protección para casi toda la exposición externa.

Los protectores solares son especialmente indicados para individuos con piel de tipo I, II, III para los de tipo IV y V (ver anexo) también pueden derivar considerable protección contra el daño agudo y crónico de la piel. La selección del factor solar de protección de un protector solar es importante, particularmente para infantes y niños (Stern, et al, 1,986; Hurwitz 1,988) ya que ellos tienen más sensibilidad en la piel que los adultos. (11)

En los últimos años se ha manifestado una seria preocupación por parte de productores, investigadores y legisladores, debido a los riesgos y peligros potenciales derivados de la contaminación micribiológica de preparados farmacéuticos y de productos de cosmética e higiene. (12)

La acción de un conservador depende de su actividad biológica intrínseca, de su disponibilidad y del pH. Mientras que la efectividad de los preservantes depende de la susceptibilidad del microorganismo al preservante, interacción de ingredientes y preservantes, selección del preservante, y aspectos de seguridad.

Aalto y Col y Bandelin señalan que la actividad de los ésteres del ácido para-hidroxibenzóico casi no es afectado por el pH. (13)

Wickliffe y Entekin en un estudio de preservación a largo plazo con los parabenos y ésteres del ácido

vainillínico utilizando tierra del suelo como fuente de microorganismos para probar la eficacia del conservador señalan que la hidrólisis de los ésteres que se puede producir con el tiempo, es capaz de producir el colapso del sistema inhibitorio del desarrollo microbiano. Esto significa que no hasta la preservación de un producto en el momento de la fabricación si no se dan al mismo tiempo seguridades al consumidor en cuanto a una potencial contaminación uno, dos o tres años luego de ser adquirido o de salir de la fábrica.

Sustancias básicas como las aminas y muchos compuestos de amonio cuaternario son más activas a niveles más altos de pH, Mueller y Seeley, probaron un cloruro de alquildimetilencil amonio a diferentes valores de pH, y hallaron que mientras se requería una concentración de 100 ppm a pH 3 para producir una morbilidad de 99.99%, a pH de 9 sólo era necesario una concentración de 10 ppm.

Todo el grupo de los compuestos de amonio cuaternario ofrecen una desventaja, como antisépticos y como conservadores, la cual radica en su falta de capacidad para cumplir un amplio espectro, siendo menos activo contra los gérmenes gram negativos en general y las pseudomonas en particular.

Los ésteres del ácido p-hidroxibenzóico, llamados por lo común parabenos. El éster metílico es efectivo contra bacterias aunque menos efectivo contra hongos. Sykes

demuestra que la concentración del éster metílico para la destrucción de bacterias en estado vegetativo en 24 horas es de 0.15 a 0.20%, pero el éster propílico es inefectivo. Sin embargo, frente a hongos en concentraciones de 0.012% es efectivo. Por lo regular se usan mezclas de ésteres metílico y propílico, esta mezcla es sinérgica como lo son otras mezclas de ésteres, en el análisis microbiológico de materiales y soluciones conteniendo parabenos. Myawwayki y Col señalaron que los ésteres metílico y propílico perdían actividad por la presencia de polietilenglicoles, polivinilpirrolidona y gelatina.

El alcohol bencílico se usa desde hace unos treinta años como conservador especialmente en inyectables.

Richards y Macbride compararon la actividad de los alcoholes bencílico, estilenbencílico y fenilelítico frente a Pseudomonas aeruginosa, resultando el alcohol etilbencílico más efectivo, siguiéndole los alcoholes feniletílico y bencílico con niveles decrecientes de actividad.

El formaldehído, se usa bastante para la conservación de productos de tocador, especialmente desde 0.005% a 0.05%.

JUSTIFICACIONES

Los productos de tocador no son estériles, debido a ello el control microbiológico de estos productos es muy importante, por estar expuestos a un alto grado de contaminación microbiana que puede deberse a la materia prima, agua, equipo de manufactura, medio ambiente, higiene personal de operarios y material de empaque, dado que productos contaminados microbiológicamente pueden afectar la salud de quien lo utiliza causando daño a la piel.

Se considera de importancia realizar estudios tendientes a conocer la efectividad de los preservantes antimicrobianos, utilizados en la industria cosmética guatemalteca para la elaboración de los bloqueadores solares, debido a que por su amplia comercialización, consumo en la actualidad y por ser producto de dosis múltiple se encuentran expuestos a la contaminación involuntaria durante su uso, por lo que es necesario un sistema preservante que asegure su estabilidad durante su tiempo de vida.

5. OBJETIVOS

- 4.1. Verificar la calidad microbiológica de productos de tocador elaborados por la industria cosmética nacional.
- 4.2. Determinar la eficacia de los preservantes antimicrobianos usados en la elaboración de los bloqueadores solares, a través de métodos microbiológicos.
- 4.3. Investigar la presencia de microorganismos en los bloqueadores solares, fabricados por los laboratorios cosméticos en Guatemala, determinando si se encuentran dentro de las especificaciones.

6. HIPOTESIS

Los preservantes antimicrobianos usados en los bloqueadores solares, fabricados en Guatemala por laboratorios cosméticos, son efectivos contra los microorganismos patógenos siguientes: Candida albicans, Aspergillus niger, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, debido a que inhiben su crecimiento.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo; está constituido por 15 bloqueadores solares en su recipiente final, fabricados por cinco de los laboratorios cosméticos nacionales, que elaboran los mencionados productos.

7.2 Medios

7.2.1 Recursos Humanos:

- Ingrid Rosana Bautista Fuentes, TESISTA
- Lic. Estuardo Serrano Vives ASESOR

7.2.2 Recursos Materiales:

- Medios de cultivo
- Agar de soya-caseína (CASO)
- Reactivos:
 - Solución salina estéril
 - Polisorbato 80
 - Solución de BACL₂ al 1.0%
 - Solución de H₂SO₄ al 1.0%
- Materiales:
 - Cajas de petri descartables.
 - Pipetas serológicas.
 - Recipientes de vidrio con tapón de rosca.
 - Probetas graduadas.
 - Frascos erlenmeyer pyrex.
 - Mechero bunsen.
 - Estufa eléctrica.

Autoclave.

Incubadora.

7.3 Procedimiento.

7.3.1 Conteo aeróbico en placa:

- Del recipiente original tomar 1.0 ml de muestra y adicionarlo a 9.0 ml de solución salina estéril al 0.1%, homogenizar.
- Tomar 1.0 ml de la dilución anterior y agregarlo a una caja de petri estéril, adicionar de 18 a 20 ml de agar CASO a una temperatura de 45-50°C, homogenizar y dejar solidificar.
- Incubar a 35°C por 48 horas.
- Luego de la incubación examinar el crecimiento, contar el número de colonias y expresar como unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra. Si no hay crecimiento de la dilución 1:10 de muestra, en resultado se expresará como: menos de 10 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) de muestra. Calcular el número de colonias por muestra, de la manera siguiente:

No. de colonias x No. de dilución

Alicouta sembrada de la dilución

- Si la muestra excede los límites microbianos sugeridos (1000 microorganismos) por mililitro de muestra, no debe utilizarse para evaluar la

efectividad del preservante.

- Recuento de levaduras y mohos, se cambia el medio de cultivo, por sabouraud dextrosa y la temperatura de incubación a 20-25°C por 5-7 días, los demás pasos son iguales al conteo de bacterias.

7.3.2 Preparación del inóculo E. coli, S. aureus, P. aeruginosa.

- Apartir de un cultivo stock de microorganismos inocular la superficie de agar soya-caseína (Agar CASO).

- Incubar el cultivo de 18-24 horas a 35°C.

- Adicionar 3 ml de solución salina estéril, dejándola resbalar por las paredes del recipiente; lavar la superficie con esta solución.

- Transferir la suspensión inoculada a un tubo estéril.

- Adicionar alícuotas de la suspensión inoculada a un tubo estéril conteniendo solución salina estéril, hasta igualar la turbidez del estándar 1 de McFarland (se obtiene una concentración de 300 millones de bacterias por mililitro).

- Apartir de la suspensión anterior preparar una dilución 1:100 agregando 1.0 ml de la suspensión inoculada a 99 ml de solución salina estéril).

- Determinar el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ML) en cada suspensión

mediante la técnica del conteo aeróbico en placa.

Candida albicans:

- Se cambia el medio de cultivo, por sabouraud y la temperatura de incubación a 20-25oC durante 48 horas, los demás pasos son iguales a la preparación del inóculo de bacterias.

Asperquillus niger:

- El medio de cultivo cambia a sabouraud y su tiempo de incubación es de 7 días a una temperatura de 20-25oC.

- Una modificación a la técnica, es que la solución salina que se agrega en el paso 3 tiene que contener 0.05% de polisorbato 80 estéril, los demás pasos son iguales a los de preparación del inóculo de bacterias.

7.3.3 Evaluación del preservante:

Procedimiento:

- Asépticamente transferir 20 ml de muestra de bloqueadores solares a un recipiente estéril con tapón.

- Inocular 1.0 ml de la suspensión de trabajo (preparada en el numeral 6.3.2 preparación del inóculo), para cada uno de los microorganismos.

- Incubar a 20-25oC.

- Determinar en cada uno de las muestras el número

de microorganismos viables a los 7, 14, 21, y 28 días, mediante la técnica de conteo aeróbico en placa.

7.3.4 Interpretación de los resultados.

El preservante antimicrobiano es efectivo sí:

- La concentración de bacterias viables es reducida al 0.1% de la concentración inicial al día 14.
- La concentración de moho y levaduras viables es igual o está debajo de la concentración inicial al día 14.
- La concentración de cada microorganismo testigo permanece igual o por debajo de la concentración inicial a los 28 días. (6)

7.4 Diseño de la investigación.

7.4.1 Tipo de muestreo:

Aleatorio para elegir los diferentes establecimientos de la ciudad capital donde se obtendrán por conveniencia las 15 muestras a ser analizadas, de los cinco laboratorios nacionales fabricantes de bloqueadores solares, en donde por marca se tomarán tres muestras.

7.4.2 Análisis de resultados:

Descriptivo (Gráficas, %), en donde se

representa si los bloqueadores cumplen con las especificaciones de menos de 1000 microorganismos por mililitro para este tipo de productos, de cumplir se evaluará si los preservantes son efectivos contra los cinco microorganismos que se le inoculara a la muestra.

8. RESULTADOS

De las 15 muestras de bloqueadores solares recolectadas en supermercados localizados en diferentes centros comerciales de la ciudad capital, provenientes de 5 laboratorios nacionales que se dedican a la elaboración de este cosmético, y que se seleccionaron en base a un muestreo aleatorio, se descarto una muestra (6.67%), debido a que en el conteo inicial efectuado (tabla 1) por el método de conteo en placa para aerobios se obtuvo un recuento que sobrepaso los límites establecidos por la CTFA (1000 UFC/g de muestra). Las restantes 14 muestras presentaron recuentos menores de 10 UFC/g de muestra, observando que el 93.37% de las muestras de bloqueadores solares cumplen el requisito establecido por la CTFA y USP (tabla No. 1).

Para determinar la actividad antimicrobiana de los preservantes en las formulaciones, se inocularon en cada muestra, cantidades mayores de 10⁶ UFC/g de muestra (tabla 2) de las cinco cepas utilizadas en este estudio, realizando conteo a los 7, 14, 21, y 28 días (tablas 3-7), al evaluarse la actividad del preservante; las 14 muestras presentaron una concentración menor de 10² UFC/g de muestra, de los cinco microorganismos inoculados (gráfica 3-7).

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Para la confiabilidad estadística de los resultados, se utilizaron tres muestras de bloqueadores solares provenientes de un mismo laboratorio fabricante, evaluando cinco laboratorios, completando un total de 15 muestras. Las muestras no garantizan ser de un mismo lote, debido a que éstas fueron adquiridas en supermercados diferentes.

Las muestras se obtuvieron directamente del lugar de comercialización debido a que al obtenerlas directamente del fabricante, implicaría que el producto obtenido no reflejara a cabalidad la calidad de los mismos; así mismo, la obtención de los mismos se dificultaría.

De las 15 muestras analizadas, hubo una muestra (6.67%) que presentó a las 48 horas de incubación, concentración bacteriana arriba de los límites establecidos (1000 UFC/g de muestra) durante el recuento inicial, pudiendo inferir con ello que el laboratorio fabricante no está cumpliendo al 100% las Buenas Prácticas de Manufactura o una posible falla debido a que el sistema de preservantes, concentración y/o calidad de estos no es la adecuada, a que existan incompatibilidades dentro de las formulaciones entre preservantes y otra materia prima, o a que la materia prima y/o el equipo que está en contacto directo con el producto durante la manufactura estén contaminados.

La Evaluación de la actividad antimicrobiana de los

preservantes se realizó en las muestras que presentaron un conteo abajo de 1000 ufc/g de muestra (93.37%) en el recuento inicial.

Para ello se les inoculó con cinco cepas ATCC de los microorganismos ya mencionados, en concentraciones mayores de 10 ufc/g de muestra, con el riesgo que esta alta carga de microorganismos impidiera el conteo, al agotarse el preservante, pero los resultados obtenidos a los 7, 14, 21, y 28 días, fueron satisfactorios, ya que no se obtuvieron recuentos mayores de 200 ufc/g de muestra, lo que nos puede indicar lo siguiente:

- El sistema preservante utilizado es compatible con los ingredientes de la formulación y cubre los diferentes tipos de microorganismos, lo que les permite controlar el crecimiento de los microorganismos inoculados.

- La concentración de los preservantes utilizados, se encuentran fuera de las concentraciones máximas sugeridas, lo que impide el crecimiento de microorganismo.

Del 6.67% de muestras no evaluadas, puede suponerse que los laboratorios fabricantes no cumplen con las Buenas Practicas de Manufactura (BPM) o los preservantes no son eficaces por varias causas como baja concentración de los preservantes, mala selección del preservante antimicrobiano y la incompatibilidad del preservante e ingredientes de la formulación.

La Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXII) recomienda hacer conteo a los 7, 14, 21, 28 días, indicando que si al 14 día de hacer el inculo no hay crecimiento significativo, no es necesario realizar el conteo a los 21 y 28 días.

Debido a que el presente estudio es de investigación, si se realizó el conteo a los 21 y 28 días, obteniendo los mismos resultados del día 7, sin embargo al realizar la evaluación de la eficacia de preservantes de una manera rutinaria, al no existir crecimiento significativo en los primeros recuentos se pueden obviar los recuentos a los 21 y 28 días.

10. CONCLUSIONES

10.1 Según las muestras analizadas, el 93.37% de bloqueadores solares elaborados por laboratorios nacionales, cumplen con los requisitos de la CTFA en relación con el contenido microbiano.

10.2 El 6.67% de los bloqueadores solares que se analizaron elaborados por laboratorios nacionales, no cumplen con los límites microbianos establecidos por la CTFA.

10.3 El preservante o asociación de preservantes utilizados en los bloqueadores solares son eficaces, pues inhiben el crecimiento microbiano después de la inoculación con cepas ATCC de Cándida albicans, E. coli, P. aeruginosa, A. niger y S. aureus.

10.4 La inhibición del crecimiento microbiano en los bloqueadores solares, puede deberse a la utilización de preservantes a concentraciones arriba del límite superior establecido por la USP XXIII.

11. RECOMENDACIONES

11.1 Se recomienda al personal de Servicios de Salud de la sección de control de alimentos y medicamentos:

- exigir a los laboratorios fabricantes, que realicen un control microbiológico estricto de cada lote elaborado para garantizar la calidad microbiológica.
- Verificar que se cumplan las Buenas Prácticas de Manufactura en los laboratorios fabricantes de productos de tocador.

11.2 Se recomienda a los laboratorios fabricantes, realizar estudios de estabilidad microbiológica acelerada, para determinar o seleccionar el sistema preservante más eficaz.

11.3 Se recomienda realizar estudios que determinen la concentración del preservante o preservantes utilizados en los productos de tocador.

12. REFERENCIAS

1. Jellynnek T. Formulation and function of cosmetics. United States of América: Wiley-interscience. 1,970. 1,225 p. (p. 98-106).
2. De la Paz A. Microbiología en cosméticos. Guatemala: USAC, 1,977 96 o. (p.8-9).
3. United States Pharmacopeia Convention Inc. USP XXII-NFXVII. 22ed. Rockville Md, United States of America. 1,985. LIV+2067 p. (p. 1478-1481).
4. Calderón ET. Bacteriostáticos; Importancia de su empleo en la industria farmacéutica y cosmética. Guatemala; Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1963, 29p. (p.3-7).
5. Oliva de Vargas VS. Evaluación de los champús que se comercializan en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1973. 44p. (p4-6)
6. Milian MA. Diseño y funcionamiento de un sistema de control de calidad microbiológico para una planta de cosméticos. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1975. 40p. (p.6-15)

7. Sánchez MM, Microbiología en cosméticos, Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1981, 46p. (p.2-8)
8. Chang ME. Comparación de la efectividad antimicrobiana de dos métodos de sanitización en el equipo principal de proceso y envasado en la industria cosmética. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1989, 34p. (p.3-15).
9. Cordón RM. Evaluación de la efectividad de preservantes antimicrobianos en champú de bebés fabricados en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1990. 45p. (p.2-25)
10. Muñoz J. Evaluación de la eficacia de los preservantes químicos utilizados en lociones para manos elaboradas en Guatemala, Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1990. 40p. (p.30-33)
11. Alas Gordillo. Eficacia de preservantes antimicrobianos en champú. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1990. 35p. (p3-15)

12. American Medical Association, División of Drugs and Toxicology Department of drug. Drugs Evaluations Annual 1992. 7a. ef. United States of America: Spring, 1992 XVIII+2203p. (p.1125-1128)..
13. Wilkinson JR. Harry's Cosmeticology. 6a. ed. Gran Bretaña: International Texbook Inc, 1973. XXIV+824p.
14. Helman J. Farmacotecnia Teórica y Práctica. México: Continental, vols. V, VI, 1981. 2620p. (p.1485-1507).

13. ANEXOS

13. ANEXOS

13.1 Organismos utilizados en el análisis:

Cándida albicans	(ATCC No. 10231)
Aspergillus niger	(ATCC No. 16404)
Pseudomonas aeruginosa	(ATCC No. 9027)
Staphylococcus aureus	(ATCC No. 6538)
Escherichi coli	(ATCC No. 8739)

13.2 Preparación de los medios de cultivo:

El tipo y modo de preparación de los medios de cultivo listos para el uso, apartir de los correspondientes medios deshidratados, son de importancia decisiva para obtener una solución transparente y un alto grado de eficacia, por ello es necesario que el material quede completamente disuelto y, por otra parte, que haya sido sometido lo menos posible a calentamiento.

Para la preparación de los medios debe utilizarse agua destilada o totalmente desmineralizada, de reacción neutra en lo posible pobre en gérmenes.

Los medios de cultivo no deben de verterse demasiado calientes a las cajas de petri. para evitar la formación de agua de condensación, enfriarlos entre 45-40oC, no deben de formarse burbujas al verter en las placas.

13.3 Esterilización:

La temperatura y tiempo de esterilización para 1.0

litro de medio de cultivo, son de 121°C por 15 minutos, si se tratan de cantidades más grandes se debe prolongar el tiempo de esterilización.

13.4 Medios de cultivo utilizados en el análisis:

- Agar CASO (agar-peptona de caseína peptonada de harina de soya.)
- Medio de cultivo exento de sustancias inhibitorias y de indicadores. Corresponde a las especificaciones de la USP XXII.

Por su rica y abundante base nutritiva estos medios de cultivo son adecuados para el crecimiento de microorganismos exigentes.

Agar CASO.

Composición (g/litro)

Peptona de caseína.....	15.0 g
Peptona de harina de soya.....	5.0 g
Cloruro de sodio.....	5.0 g
Agar-agar.....	15.0 g

Preparación:

Disolver 40g.litro, esterilizar en autoclave, pH

7.3+0.1.

Agar Dextrosa Sabouraud:

Para cultivo, aislamiento e indentificación de hongos patógenos, especialmente para dermatofitos por la glucosa que contiene, y para levaduras y mohos es preferible la maltosa. Para inhibir el crecimiento de

bacterias, se ajusta el pH a 5.6.

Composición: (g/litro)

Peptona de carne.....	5.0 g
Peptona de caseína.....	5.0 g
D-Glucosa.....	20.0 g
Agar-agar.....	17.0 g

Preparación:

Disolver 47 g/litro y esterilizar en autoclave no recalentar, y no fundir de nuevo pH 5.6 + 0.1.

Reactivo 1 de McFarland:

Composición:

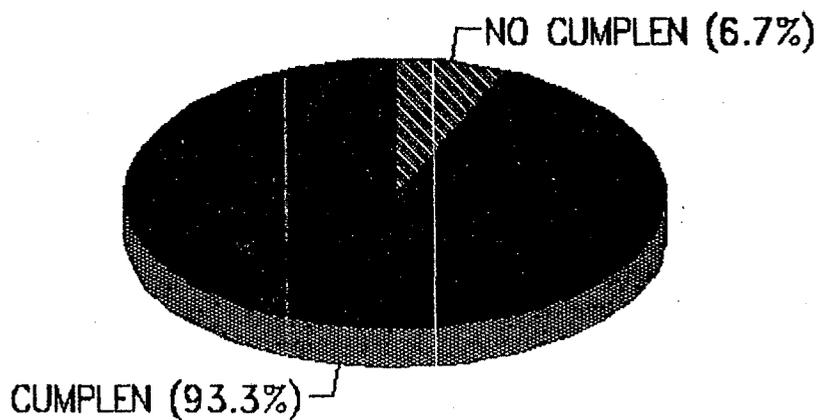
Cloruro de bario (1.0%	0.1 ml
Acido Sulfúrico.....	9.9 ml
Densidad de Bacterias 300 millones por mililitro.	

Solución salina estéril TS:

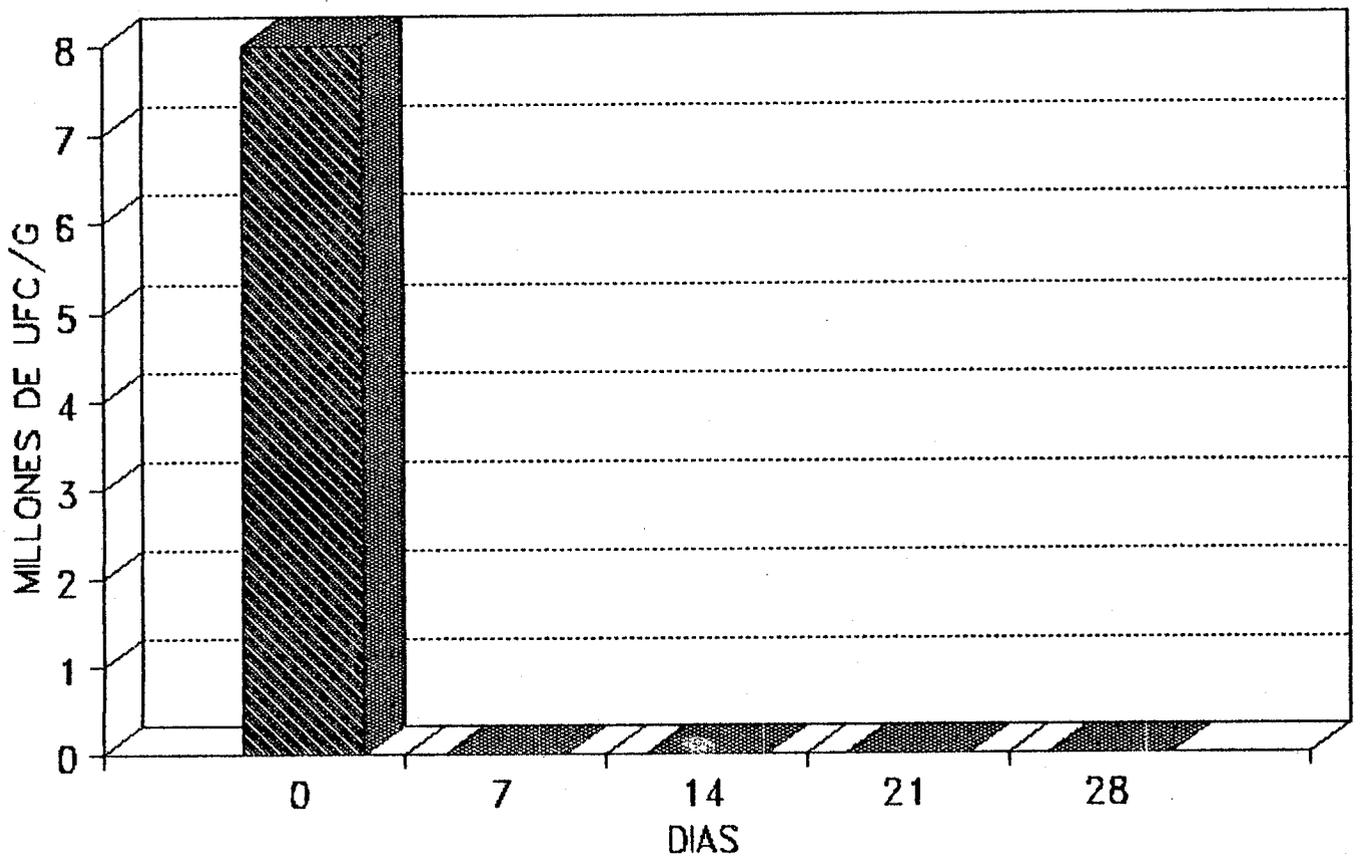
Composición: (g/litro)

Cloruro de Sodio.....	90.0 g
Agua c.s.p.....	1000.00 ml

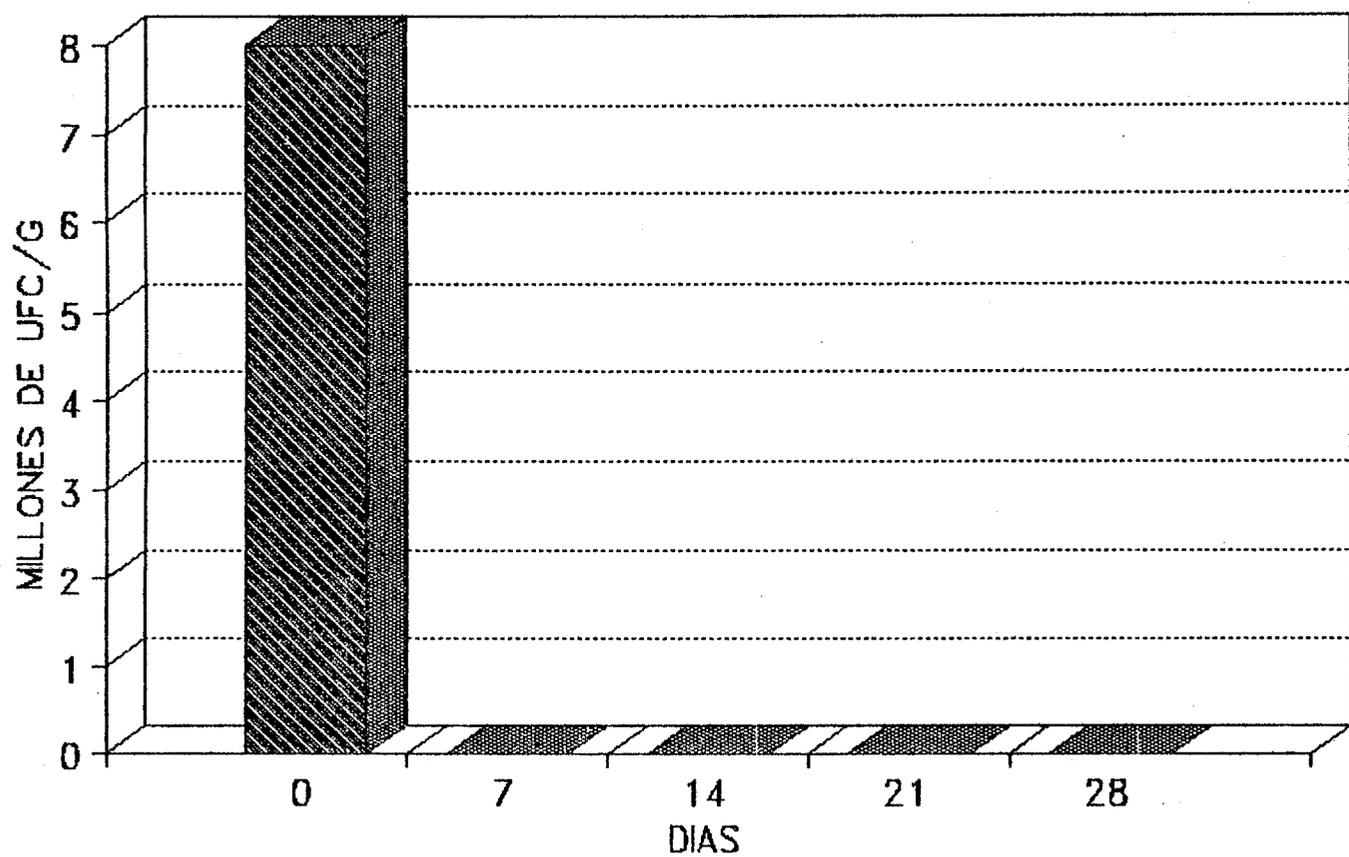
RECUENTO TOTAL AEROBICO SEGUN LIMITES DE CTFA



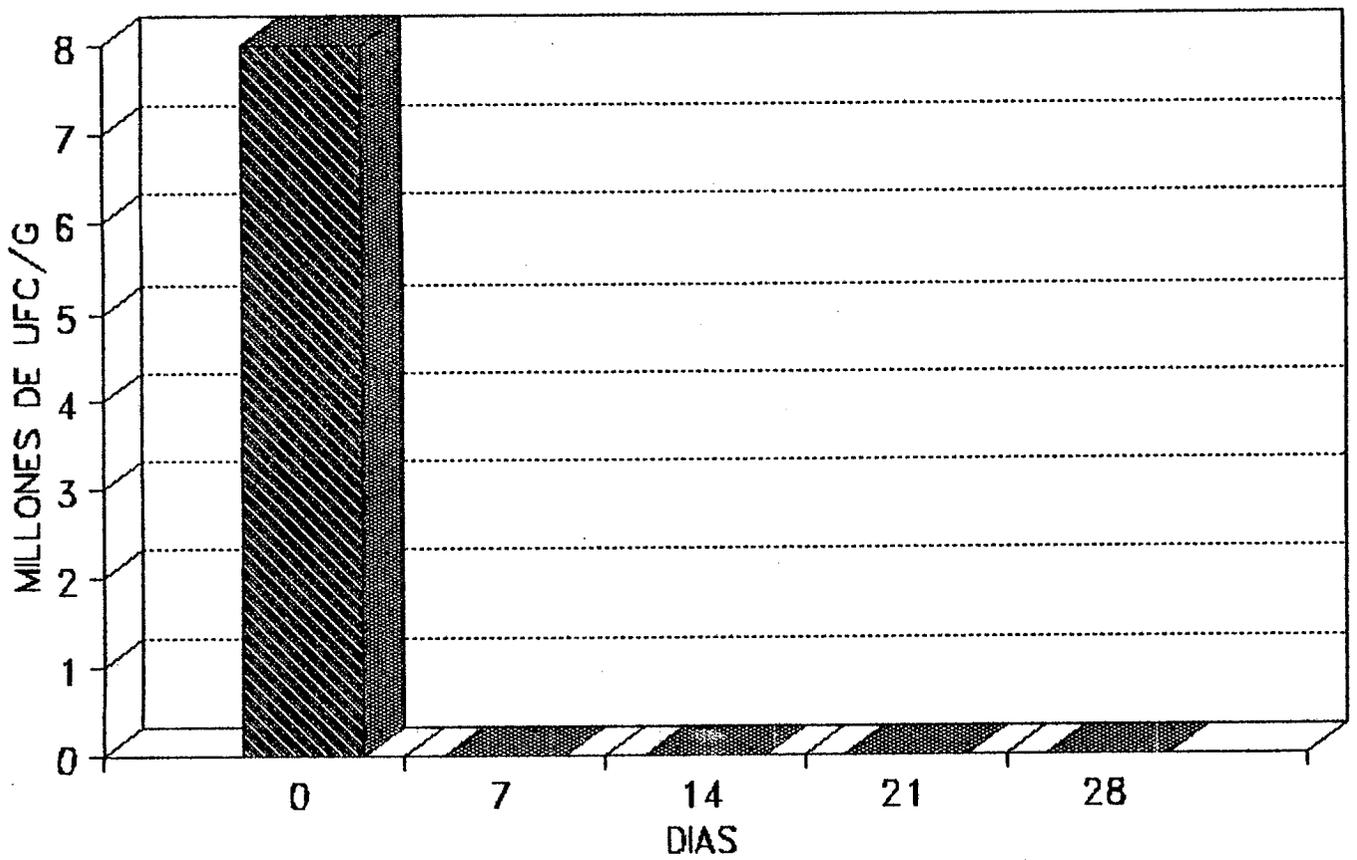
RECUENTO DEL INOCULO DE P. AERUGINOSA EN LAS MUESTRAS



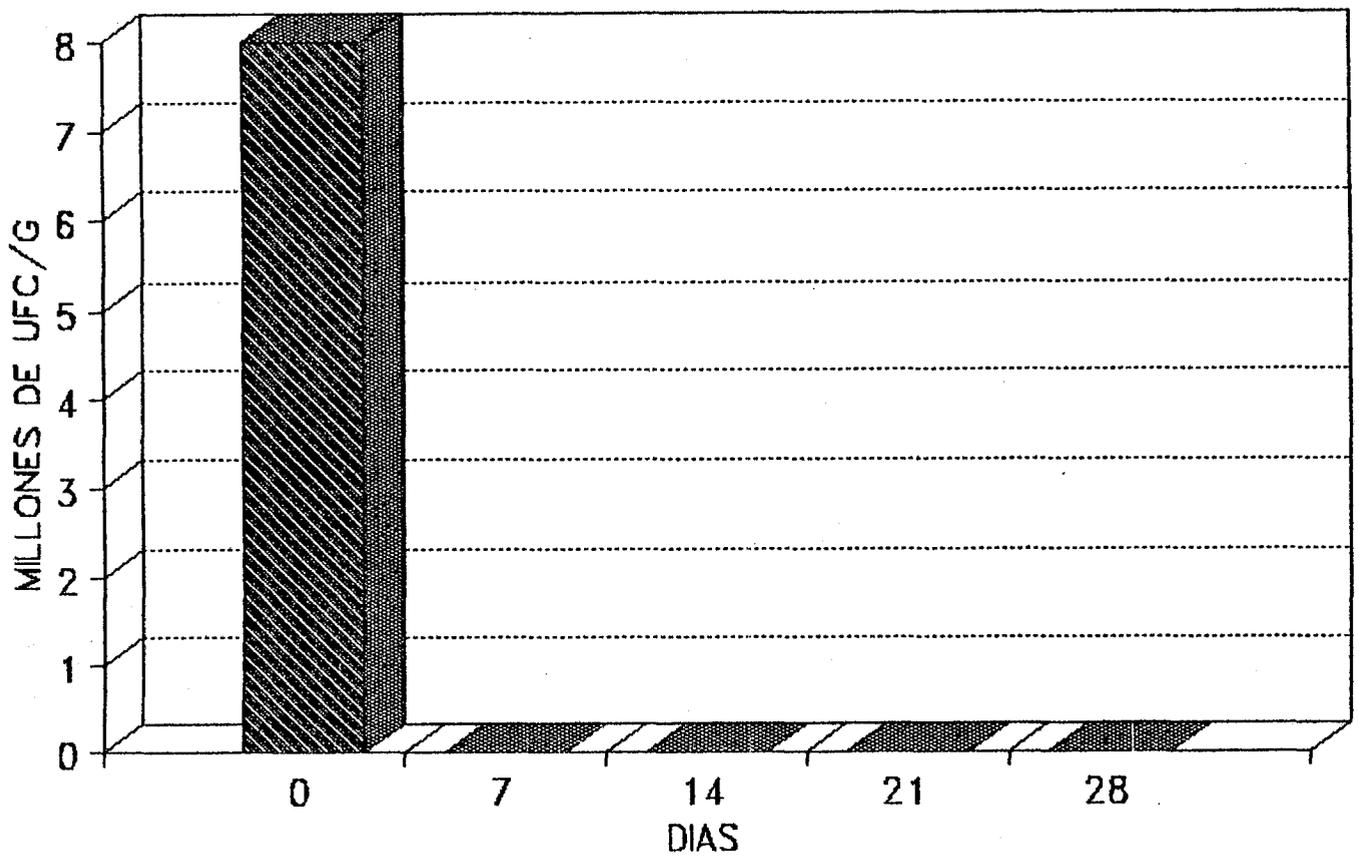
RECuento DEL INOCULO DE A. Niger EN LAS MUESTRAS



RECUESTO DEL INOCULO DE E. Coli EN LAS MUESTRAS



RECuento DEL INOCULO DE *C. albicans* EN LAS MUESTRAS



RECuento DEL INOCULO DE *S. aureus* EN LAS MUESTRAS

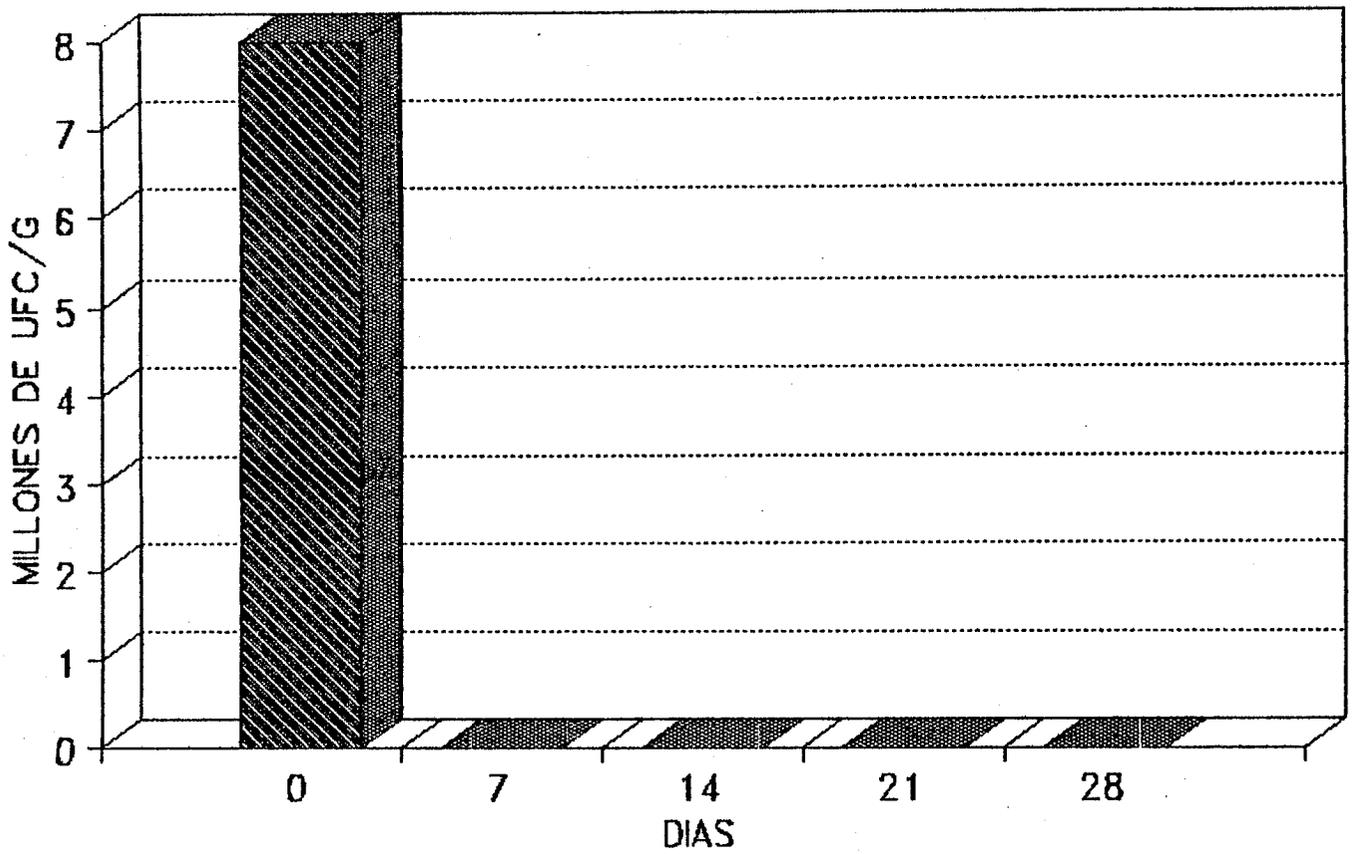


TABLA No. 1

RECuento INICIAL DE AEROBIOS TOTALES EN BLOQUEADORES SOLARES

No. MUESTRA	DILUSION	CONTEO EN UFC/G
1	1/10	10
2	1/10	10
3	1/10	10
4	1/10	100
5	1/10	10
6	1/10	MAS DE 100
7	1/10	10
8	1/10	10
9	1/10	10
10	1/10	10
11	1/10	10
12	1/10	10
13	1/10	10
14	1/10	10
15	1/10	10

TABLA No. 2

CONCENTRACION DE LOS INOCULOS UTILIZADOS

INOCULO DE:	DILUCION	CONCENTRACION UFC/ML
A. BACTERIAS		
Escherichi coli	1/100	Mas de 10.
Sthaphylococcus aureus	1/100	Mas de 10.
P. aeruginosa	1/100	Mas de 10.
B. HONGO		
Aspergillus niger	1/100	Mas de 10.
C. LEVADURA		
Candida albicans	1/100	Mas de 10.

TABLA No. 3

**RECuento DEL INOCULO DE *Candida albicans* EN MUESTRAS
DE BLOQUEADORES SOLARES**

RECuento EN UFC/G de muestra a los

No. DE MUESTRA	7 día	14 día	21 día	28 día
1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
3	100	100	100	100
4	100	100	100	100
5	100	100	100	100
6	100	100	100	100
7	100	100	100	100
8	100	100	100	100
9	100	100	100	100
10	100	100	100	100
11	100	100	100	100
12	100	100	100	100
13	100	100	100	100
14	100	100	100	100
15	100	100	100	100

TABLA No. 4

RECuento DEL INOCULO DE *Escherichia coli* EN MUESTRAS DE
BLOQUEADORES SOLARES

No. de Muestra	RECuento EN UFC/G DE MUESTRA A LOS			
	7 dia	14 dia	21 dia	28 dia
1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
3	100	100	100	100
4	100	100	100	100
5	100	100	100	100
6	100	100	100	100
7	100	100	100	100
8	100	100	100	100
9	100	100	100	100
10	100	100	100	100
11	100	100	100	100
12	100	100	100	100
13	100	100	100	100
14	100	100	100	100
15	100	100	100	100

TABLA No. 5

**RECuento DEL INOCULO DE Staphilococcus aureus EN MUESTRAS DE
BLANQUEADORES SOLARES**

No. de Muestra	RECuento EN UFC/G DE MUESTRA A LOS			
	7 día	14 día	21 día	28 día
1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
3	100	100	100	100
4	100	100	100	100
5	100	100	100	100
6	100	100	100	100
7	100	100	100	100
8	100	100	100	100
9	100	100	100	100
10	100	100	100	100
11	100	100	100	100
12	100	100	100	100
13	100	100	100	100
14	100	100	100	100
15	100	100	100	100

TABLA No. 6

DESCUENTO DEL INOCULO DE *Aspergillus niger* EN MUESTRAS DE
BLOQUEADORES SOLARES

No. DE MUESTRA	RECuento EN UFC/G DE MUESTRA A LOS			
	7 día	14 día	21 día	28 día
1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
3	100	100	100	100
4	100	100	100	100
5	100	100	100	100
6	100	100	100	100
7	100	100	100	100
8	100	100	100	100
9	100	100	100	100
10	100	100	100	100
11	100	100	100	100
12	100	100	100	100
13	100	100	100	100
14	100	100	100	100
15	100	100	100	100



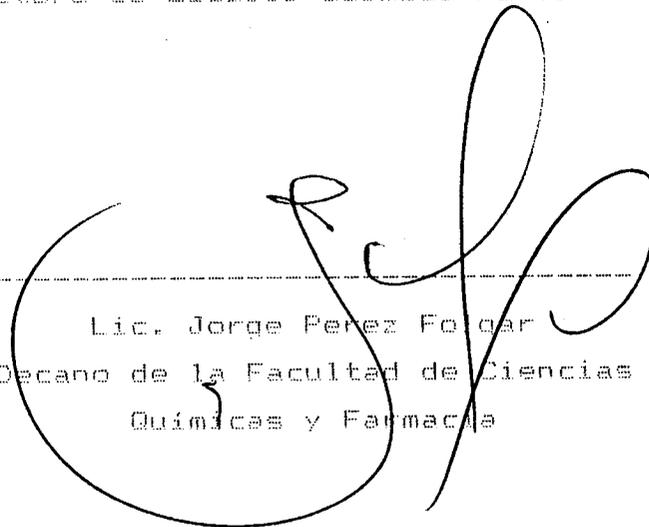
INGRID ROSANA BAUTISTA FUENTES
Autora



Lic. ESTUARDO SERRANO VIVES
Asesor



Licda. Beatriz Batres.
Directora de Escuela Química Farmacéutica



Lic. Jorge Pérez Fogar
Decano de la Facultad de Ciencias
Químicas y Farmacia