



63
24
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE LA FUNCION DE
LOS CONSERVADORES EN LOS
PRODUCTOS COSMETICOS



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

MARGARITA GUERRERO SOLANO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE:

Paginas:

Capítulo I:

Introducción. 1

Capítulo II:

Contaminación en cosméticos: 3

A) Aspectos teóricos y factores que influyen en la selección de los conservadores. 3

B) Factores que afectan el desarrollo microbiano. 5

C) Factores que contribuyen a la contaminación en cosméticos. 6

Capítulo III:

Perfil microbiológico. 9

Investigación de microorganismos patógenos: 10

A) Bacterias:

a) *Pseudomona aeruginosa*. 10

b) *Staphylococcus aureus*. 12

c) Enterobacterias. 14

Escherichia coli. 15

E) Hongos. 16

a) *Candida albicans*. 17

b) *Aspergillus niger*. 17

Capítulo IV:

Conservadores.	19
A) Proceso de selección. Propiedades a considerarse para un conservador en una fórmula cosmética.	19
B) Mecanismo de acción de los conservadores.	29
C) Posible mecanismo de acción de algunos conservadores.	23
D) Frecuencia de uso de los conservadores en las fórmulas cosméticas según la FDA.	30

Capítulo V:

Investigación teórica de algunos conservadores:	31
A) Esteres del ácido p-hidroxibenzoico.	31
B) Germall 115.	35
C) Kathon CG.	39
D) Bronidox L.	42
E) Euxyl K 400.	44

Capítulo VI:

Límites microbiológicos.	45
--------------------------	----

Capítulo VII:

Buenas Prácticas de Manufactura (GMP).	47
--	----

Capítulo VIII:

Parte práctica:	50
1.- Producto analizado.	50

2.- Resultados.	56
3.- Conclusiones.	57
Capitulo IX:	
Glosario.	59
Capitulo X:	
Bibliografía.	66

En el desarrollo y producción de cosméticos el problema de la conservación es muy importante, ya que un producto preservado adecuadamente debe poder soportar el ataque bacteriano; los microorganismos que entren al cosmético, sin importar la vía, no deben multiplicarse y de hecho el ideal es que mueran.

Cada producto debe tener su sistema conservador específico, el cual se debe escoger no solo teórica sino prácticamente, realizando pruebas en el laboratorio.

El conservador tiene tres funciones:

1.- Reducir el número de microorganismos en el producto, provenientes de la materia prima (incluyendo agua).

2.- Reducir el número de microorganismos en el producto, provenientes de sus procesos de fabricación, en los cuales debe evitarse cualquier posibilidad de contaminación, y para lograr esto es necesario conducirse dentro de rigurosas normas de higiene llamadas en su conjunto "BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA".

3.- Prevención de la contaminación causada por el consumidor. Con el objeto de prevenir la contaminación causada por el consumidor durante el uso del cosmético es necesaria la presencia de un buen sistema conservador, así como el uso de aplicadores, tubos depresibles, atomizadores y cualquier tipo de envase que evite el contacto directo con el producto.

Se debe tomar en cuenta que el término contaminación se limitará a la presencia de microorganismos patógenos o de otro tipo, siempre y cuando representen un peligro para la integridad física del individuo.

Por lo antes mencionado, a través de este trabajo se tratará de hacer conciencia sobre la importancia que tiene el buscar un conservador adecuado a cada formulación, que éste sea estable a lo largo de toda la vida útil del producto, desde su fabricación hasta su consumo. Se hará mención sobre una serie de estrategias que se deben seguir para la preservación de un cosmético, así como de las "Buenas Prácticas de Manufactura". Todo encaminado a conocer mejor éste fenómeno que es la contaminación microbiana, para estar preparados y contribuir a resolverlo.

A) Aspectos teóricos y factores que influyen en la selección de los conservadores.

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 microbiológica de los productos de cosmética e higiene, considerándolos desde dos puntos de vista:

1.- En primer lugar, en cuanto atañe al consumidor del producto, cuya salud puede afectarse.

2.- En segundo lugar, en lo que se refiere a la estabilidad del preparado, que puede verse comprometida si la calidad y la cantidad de gérmenes se halla por encima de la tolerancia. En éste caso, la contaminación puede llegar a ocasionar cambios definitivos, irreversibles en las características del producto, con el consiguiente perjuicio económico.

Se entiende por conservación el mantener un producto determinado en condiciones estables. Tomando en cuenta que un producto cosmético puede ser afectado por diversas causas como pueden ser:

a) Influencias fisicoquímicas como luz, oxígeno, calor y material de envase.

b) Encimas, las cuales pueden introducirse al producto con los extractos vegetales ó animales.

c) Y por microorganismos que pueden llegar al cosmético a través de materias primas, proceso de elaboración ó el ser utilizado por el consumidor.

Un producto preservado adecuadamente debe poder soportar el ataque microbiano ya que, como se dijo anteriormente, los microorganismos que entren al cosmético, sin importar la vía, no deben multiplicarse y lo ideal es que mueran.

Dentro de la Microbiología de Cosméticos el principal peligro de los microorganismos presentes es lo que puede ocurrir en contra del producto mismo. La falta de una preservación adecuada produce:

- a) Crecimiento de microorganismos llegando a producir masas visibles de hongos y/o mucosidades.
- b) Ruptura de la emulsión.
- c) Cambio de coloración.
- d) Alteración en el olor.
- e) Enturbiamiento.
- f) Formación de gas provocando en ocasiones la explosión del envase.
- g) Modificación de la viscosidad.
- h) Variación de pH.
- i) Separación de fases.

Es decir, se presentan problemas estéticos del producto,

además el consumidor se puede ver afectado por un producto en mal estado.

B) Factores que afectan el desarrollo microbiano.

Hay varios factores que determinan si los microorganismos encuentran un cosmético ó medio favorable para su crecimiento o no:

- 1.- De hecho, la composición del cosmético proporciona muchos de los nutrientes que necesitan los microbios.
- 2.- La forma física es importante, por ejemplo las emulsiones de aceite en agua son más propensas a tener una diseminación rápida de microorganismos que las de agua en aceite.
- 3.- El contenido de agua es importante, mientras más haya, más probabilidades hay de un crecimiento microbiano vigoroso. Los microbios prefieren un contenido alto de agua, por lo general superior al 15%.

Los polvos secos se hacen susceptibles al crecimiento microbiano cuando se acumula la humedad en la superficie de los mismos al exponerse al aire.

- 4.- pH las bacterias prefieren un medio ó condiciones neutras ligeramente alcalinas, mientras que los hongos las prefieren ligeramente ácidas.
- 5.- Protección de amplio espectro, existe una competencia de los microorganismos por los nutrientes que se encuentran en un cosmético. Un conservador con espectro reducido puede matar un tipo de contaminante y permitir el crecimiento de otro no esperado. Por lo tanto es importante que haya una protección de

amplio espectro contra bacterias, levaduras y hongos.

6.- La temperatura es otro factor que tiene importancia en el desarrollo de microorganismos. Es típico que los hongos y levaduras se desarrollen bien a temperatura ambiente, mientras que las bacterias funcionan mejor a temperaturas ligeramente elevadas, aunque el crecimiento óptimo está entre 30°C y 35°C hay algunas que lo hacen mejor a 25°C. Por lo cual una loción cosmética que se mantenga a temperatura ambiente en casa puede ser susceptible a microbios diferentes a los de una loción bronceadora que se queda en el coche caliente o en la playa soleada.

La contaminación microbiana es un fenómeno que se debe conocer mejor para estar preparados y contribuir a resolverlo.

C) Factores que contribuyen a la contaminación en cosméticos.

a.- Materias primas: Existe una gran variedad de materias primas de las cuales algunas muestran niveles peligrosos de contaminación. La más importante es el agua, considerada el contaminante número uno en cosméticos, ya que es la fuente más frecuente de *Pseudomona aeruginosa*, sobre todo si se trata de agua desionizada o desmineralizada que se ha mantenido en almacenamiento. También son susceptibles de contaminación los colorantes, pigmentos, los talcos, las soluciones de detergentes y todos los materiales de origen animal o vegetal como son las gomas naturales, almidones, etc.

b.- Equipo de manufactura: Las condiciones higiénicas del local repercuten necesariamente en el producto elaborado. Contar

con pisos, techos y paredes limpios y sin superficies rugosas o permeables, mantener un control efectivo de roedores e insectos, evitar la circulación de aire y polvo, etc. no garantizan la fabricación de cosméticos no contaminados, pero si son indispensables dentro de las normas comunes para lograrlo, sobre todo para aquellos productos que no incluyen ningún calentamiento durante su elaboración. Es indispensable la limpieza y desinfección de todo el equipo mediante agentes físicos o químicos que garanticen su conservación en condiciones apropiadas entre una fabricación y otra.

c.- Higiene personal: La piel y el cabello de las personas están altamente contaminados. Si se añade el polvo que se adhiere a sus ropas, se tiene una fuente de contaminación potencial. Es recomendable lavarse frecuentemente las manos, usar guantes protectores y cofias para el cabello, así como realizar exámenes periódicos que aseguren, hasta donde sea posible, la condición sanitaria de los operadores.

d.- Materiales de empaque: El empaque primario suele ser una fuente de contaminación, por lo que deben conservarse en lugares limpios y secos, de preferencia en bolsas o envases cerrados que no permitan la entrada de polvo.

f.- Contaminación secundaria: Es la contaminación que se genera durante el uso del cosmético hasta su terminación. Es la más difícil de predecir, ya que es muy diversa y prácticamente imposible de evitar. Según Wallhousser, cada vez que se introduce un dedo en una crema para tomar una porción, se deja de 20 a 100

gérmenes que pueden reproducirse en el producto. La única solución es la presencia de un buen conservador y puede ayudar el uso de aplicadores, atomizadores, tubos depresibles, sistemas en aerosol y cualquier tipo de envase que evite el contacto directo del producto con el consumidor.

De los microorganismos que se han reportado como contaminantes, aislados de productos cosméticos, pueden citarse 13 géneros de bacterias, 17 de hongos y 3 de levaduras. De todos éstos, la *Pseudomona aeruginosa* es de las más frecuentes y peligrosas.

Algunos de los géneros reportados son los siguientes:

HONGOS	BACTERIAS	LEVADURAS
Absidia	Achromobacter	Candida
Alternaria	Aerobacter	Saccharomyces
Aspergillus	Bacillus	Zygosaccharomyces
Citromyces	Enterococcus	
Cladosporium	Escherichia	
Dematium	Klebsiella	
Fusarium	Micrococcus	
Helminthosporium	Prcteus	
Geotrichum	Pseudomonas	
Mucor	Sarcina	
Paecilomyces	Serratia	
Penicillium	Staphylococcus	
Phona	Streptococcus	
Pullularia		
Rhizopus		
Verticillium		

De éstos algunos pueden destruirse mediante calentamiento a 70 - 80 °C por 20 a 30 minutos, otros requieren hasta 100 °C y una atmósfera de presión durante 30 minutos para ser destruidos.

Investigación de microorganismos patógenos.

A) Bacterias

a).- *Pseudomona aeruginosa*: El género *Pseudomonas* está compuesto por bacilos gram-negativos móviles que producen pigmentos hidrosolubles que se difunden a través del medio. Se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo, agua clorada, desionizada, desmineralizada, aguas negras y en el aire. No fermenta la lactosa y forman colonias redondas, lisas, de color verdoso fluorescente y de olor aromático dulzón; de las colonias se difunde un pigmento verdeazul hacia el medio, el cual se detecta con facilidad en un medio de agar incoloro. Es patógena solamente cuando se introduce en áreas que carecen de defensas normales ó cuando participa de infecciones mixtas; se le ha asociado a procesos supurativos, infecciones de córnea, úlcera, otitis, mastoiditis, y puede producir septicemias, etc. Es de los microorganismos más frecuentes y peligrosos en cosméticos. Se reproduce fácilmente en válvulas, tubos en U, filtros de cerámica, medidores de flujo, equipos de desmineralización y, en general, en cualquier parte del equipo que no pueda desinfectarse con frecuencia. Una de las razones por lo cual este microorganismo es especialmente peligroso es porque es resistente a muchos antibióticos los que, al administrarse en cantidades masivas, eliminan casi toda la flora normal que puede competir con la *Pseudomona*, favoreciendo su desarrollo en forma indirecta.

También suele crecer en aceites hidrocarbonados, petrolatos, detergentes activos, pigmentos, y especialmente en aquellos productos que son emulsiones de aceite en agua y que tienen un pH entre 7.0 y 8.5, ya que a la vez contienen una cantidad significativa de agentes no iónicos (Tween 80). Se ha aislado de máscaras para pestañas, lociones para manos y cuerpo, lociones para cara, lociones fijadoras para el cabello, champoos, etc.

La Pseudomona no solo es responsable de la descomposición de cosméticos, sino también de alimentos y de productos farmacéuticos, como es el caso de compuestos oftálmicos cuyos ejemplos más conocidos son las infecciones oculares ocurridas en Suecia e Inglaterra. Esta bacteria es la responsable de muchos daños serios a los ojos y a veces hasta de la pérdida de la vista.

En ocasiones se ha aislado Staphylococcus, levaduras y mohos pero rara vez mezclados con la Pseudomona. La experiencia ha demostrado que un producto con preservación deficiente solo se ve contaminado por un microorganismo específico, esto es, una crema susceptible a la Pseudomona no lo es a los Staphylococcus o levaduras, aún cuando una infección fulminante de Pseudomonas puede abrir camino a un subsecuente crecimiento de moho. Las formulaciones que contienen emulsificadores no-iónicos han demostrado ser más propicias a la contaminación de estas bacterias, que aquellas que contienen emulsificadores aniónicos o catiónicos.

Propiedades de la Pseudomona: Solamente en algunos casos puede reconocerse mediante alguna de sus propiedades más notables como la formación de pigmento, o por exámen microscópico, ya que se pueden considerar como bastoncitos Gram negativos móviles, con prueba de oxidasa positiva.

Las Pseudomonas psicrófilicas pueden hallarse en el suelo, agua dulce, la piel, los alimentos y en el excremento.

La lectura de publicaciones sobre el crecimiento de ésta bacteria en los cosméticos y otros productos comerciales revela las posibilidades de éste género como son: Producción de lipasas y oxidación de los ácidos grasos, fermentación de la lactosa, maltosa, celobiosa y melibiosa. Sus enzimas licúan la gelatina, atacan la caseína, producen amilólisis y son más activas a los 25 ° C y en un pH de 7 a 8. Son microaerofílicas; pocos microorganismos tienen su capacidad para crecer a 0 ° C.

b).- Staphylococcus aureus

No es un contaminante usual en los cosméticos; por lo general procede del personal que elabora los cosméticos y se ha encontrado en diferentes productos.

Los estafilococos son las bacterias piógenas por excelencia. Producen inflamaciones y supuraciones en todos los órganos y tejidos del cuerpo. Ocasiona desde lesiones mínimas localizadas hasta infecciones generalizadas, de evolución muy aguda ó crónica. Da lugar a inflamación, necrosis y formación de abscesos.

Dentro del género Staphylococcus está la especie aureus ó estafilococo dorado que es la especie patógena por excelencia.

Características:

Son cocos esféricos o algo aplanados, que se agrupan en racimos. Inmóviles, no esporulados, Gram positivos. El diámetro medio es de 0.8 micras, con límites entre 0.5 - 1.2 micras, habitualmente son no capsulados. Se desarrollan bien en medios simples, a la temperatura óptima de 35 ° C, con márgenes muy amplios entre 15 ° C y 40 ° C. El pH óptimo es de 7.4. Son aerobios y anaerobios facultativos. A las 24 hrs. se observan colonias grandes, de 2 mm de diámetro, redondas convexas, opacas brillantes, de borde continuo, con consistencia de manteca y fácilmente emulsionables. Las colonias pigmentadas son de color amarillo dorado que varía en tono e intensidad. Se desarrollan bien en las placas de agar sangre, produciendo colonias hemolíticas de alrededor de 2-3 mm. de diámetro en 24 horas. Las colonias son lisas, dejando un halo totalmente incoloro alrededor de la colonia.

Decoloran el azul de metileno y la tincura de tornasol. Reducen los nitratos y nitritos. Son catalasa positivos. No forman indol.

En el laboratorio, las cepas patógenas se clasifican como tales, es decir como *Staphylococcus aureus* por su capacidad de fermentar el manitol y de coagular el plasma. Las características del estafilococo dorado es ser manitol positivo y coagulasa positivo.

Las colonias pigmentadas pierden a veces la capacidad de formar pigmento, cambiando de amarillas a blancas, sin que esto

llegue a ocasionar cambio alguno en el poder patógeno, por lo que es necesario recurrir a las pruebas mencionadas del manitol y de la coagulasa para incluir ó no a la cepa aislada en la especie de estafilococo dorado.

Los estafilococos forman parte de la flora normal de la piel humana y de los aparatos respiratorio y digestivo; se encuentran también en el aire y en los lugares habitados por el hombre; se les ha aislado de las fosas nasales y garganta de médicos, enfermeras y pacientes. El prototipo de la lesión estafilocócica es el furúnculo u otro absceso localizado. El establecimiento de grupos de estafilococos en un folículo piloso da lugar a necrosis del tejido.

c).- Enterobacterias

Los organismos entéricos son un gran grupo de bacilos gram negativos, no esporulados, cuyo habitat natural es el intestino del hombre y de los animales. Las bacterias intestinales son aerobias fermentan una gran cantidad de carbohidratos y poseen una estructura antigénica compleja. Pueden llegar a los cosméticos mediante el personal, el agua, las materias primas, etc. Han sido encontrados en gran cantidad de productos.

Las enterobacterias se transforman en patógenos cuando alcanzan tejidos fuera del intestino, particularmente de las vías biliares, los pulmones, vías urinarias, el peritoneo o las meninges, provocando inflamaciones en estos sitios. Cuando las defensas del huésped son inadecuadas (infancia, vejez, etc.) las

bacterias coliformes pueden alcanzar la corriente sanguínea y provocar septicemias.

Algunas son resistentes a antibióticos de uso común.

Las enterobacterias además causan descomposición de ciertos cosméticos y alteran las propiedades beneficiosas de algunos de ellos, como el caso de los que contienen extractos de proteínas donde ciertos aminoácidos son fácilmente atacados por E. coli principalmente, así como de otras enterobacterias.

Escherichia coli.

E. coli es la especie predominante en el intestino grueso; por ello se denomina también "colibacilo", pero también pueden provocar enfermedades en cualquier otra parte del organismo. Algunas variedades son responsables de la gastroenteritis infantil. Su presencia en el agua indica generalmente la existencia de contaminación fecal, por lo que las pruebas encaminadas a detectar su presencia son altamente utilizadas en los laboratorios de salud pública.

Propiedades generales.- La E. coli son bacilos gramnegativos no esporulados, aerobios, carentes de esporas; la mayoría de las cepas son móviles y carecen de cápsula. Producen endotoxinas en su pared celular. Las endotoxinas son lipopolisacáridos complejos, que producen una serie de efectos fisiopatológicos como son la pirogenicidad (producen fiebre). La E. coli fermenta la lactosa con formación de ácido y gas. Produce indol en caldo peptonado.

E. coli forma colonias redondas, convexas y lisas, con bordes definidos. Algunas cepas de E. coli son hemolíticas en gelosa sangre. Al crecer en caldo da origen a una turbiedad uniforme. La mayoría de éstas cepas poseen flagelos y por tanto son móviles. Las colonias típicas de E. coli se reconocen generalmente a través de su aspecto característico en ciertos medios diferenciales como es el agar de Mc. Conkey, en el cual las colonias son rojas ó rosadas, no son mucoides, pueden rodearse de un precipitado opaco de sales biliares y como fermentan la lactosa, tienen un brillo metálico fácilmente visible; esto mismo sucede en el medio de eosina-azul de metileno. Los organismos aislados en los medios diferenciales se identifican posteriormente mediante pruebas bioquímicas y serológicas.

B) Hongos

Los hongos proceden del aire, agua, de las materias primas como: Parafina líquida, petrolato, miristato de isopropilo y aceites hidrogenados; en general de extractos de proteínas, talco, caolín, esterato de zinc, carbonato de magnesio; algunos como Candida albicans proceden del personal.

Los hongos han sido tradicionalmente considerados como semejantes a las plantas. Muchas especies crecen por extensión continua y formando estructuras ramificadas semejantes a yemas. Son inmóviles, excepto los gamentos flagelados de algunas especies acuáticas, y sus paredes celulares son muy semejantes en espesor,

composición química y estructura ultramicroscópica, a las de las plantas.

Los hongos crecen como células únicas (levaduras) o como colonias filamentosas multicelulares (mohos). Las formas multicelulares no poseen hojas, troncos, ni raíces y son mucho menos diferenciadas que las plantas superiores. Sin embargo en comparación con las bacterias, muchas especies de hongos poseen un grado superior de diferenciación.

Todos los hongos son grampositivos y algunas especies de *Nocardia* son también ácido resistentes.

Cierto número de hongos no son patógenos para personas sanas, pero pueden serlo para personas afectadas de diferentes enfermedades (por ejem. diabetes) así como las que han sido tratadas intensamente con medicamentos antibacterianos de amplio espectro o sometidos a tratamientos inmunosupresores. La mayor parte de las especies de *Candida*, *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Mucor* constituyen este grupo de hongos oportunistas.

a) *Candida albicans* es dimórfico. En la superficie de los medios sólidos ricos crece como levaduras gemantas ovales, pero cuando lo hace en la profundidad del medio, puede formar hifas. Crecen fácilmente en los medios habituales a la temperatura ambiente o a 37°C. En los cultivos en medios sólidos, las colonias recientes se asemejan a las bacterianas, son lisas y cremosas, pero las colonias viejas son grandes y aparecen hundidas y rugosas.

b) *Aspergillus niger*

La aspergilosis del oído externo, de los senos nasales, y de

los pulmones es un cuadro bien conocido. En el exámen directo del material de ésta procedencia, pueden encontrarse fragmentos de hifas acompañadas de pequeñas esporas redondas. El cultivo en medio de Saboraud a temperatura ambiente produce rápidamente colonias blancas algodonosas, que toman más tarde un color verde más o menos oscuro. El exámen microscópico de este cultivo muestra los conidióforos hinchados típicos, que soportan estructuras ensanchadas denominadas esterigmas portadores, a su vez, de pequeñas cadenas de esporas. La aspergilosis es más frecuente en quienes reciben antibióticos o cortisona, o muestran una baja resistencia a las enfermedades, con trastornos como la agnucitosis.

Capítulo IV CONSERVADORES

Los conservadores se consideran como métodos químicos mediante los cuales una sustancia química puede inhibir o destruir microorganismos bajo condiciones normales de formulación, fabricación, almacenamiento y usos.

a) Proceso de selección. Propiedades a considerarse para un conservador en una fórmula cosmética.

Cada producto debe tener su conservador o sistema conservador específico. Existen más de 250 sistemas conservadores. Hay bastantes variables que influyen en su efectividad.

1.- Se debe tomar la decisión sobre que tipo de actividad se requiere, por ejemplo los productos para bebé y área ocular deben ser estériles o por lo menos contener un pequeño número de microorganismos no patogénicos. Los productos que se aplican directamente a la piel irritada, como lociones para después de afeitarse, aceites y cremas para broncearse deben estar libres de microbios ya sea patógenos o no. Y el conservador debe eliminar toda contaminación accidental que ocurra durante su uso. Por lo tanto, para todos estos tipos de productos se debe usar un conservador microbicida. En cambio, otro tipo de productos sólo requieren que el sistema conservador sea microbiostático, que mantenga al producto libre de microbios patogénicos y que el número de microorganismos no patógenos decline con el tiempo. Por

todo esto, es muy importante decidir que tipo de conservador y a que concentración se utilizará.

2.- El conservador debe tener un espectro antimicrobiano adecuado; se debe conocer la concentración a la cual se utiliza el conservador, "la concentración efectiva" en el producto terminado ya que, cuanto más alta la concentración de éste, más alta la efectividad, pero puede resultar más tóxico o irritante. Si la concentración de un conservador no puede aumentarse por razones de toxicidad, solubilidad o sensibilización, el uso de sistemas binarios o terciarios es lo recomendable.

3.- El conservador debe ser compatible con todos y cada uno de los ingredientes de la fórmula y con el enpaque. El efecto de otros componentes es el factor más complejo de todos y quizá la razón más común de las fallas de estos conservadores. Algunos compuestos orgánicos forman una capa alrededor de una célula microbiana que le da protección contra el ataque químico. Muchos componentes de los cosméticos inactivan o disminuyen la actividad de los agentes antimicrobianos, ya sea mediante una reacción con ellos absorbiendo ó disolviéndolos. Ejemplo, las proteínas inactivan al F-37 así como los donadores de F-37 (Dowicil, Germall 115, Brotan, etc.), a los fenoles, parabenos, catiónicos y mercuriales por enlaces químicos o interacción física, o los surfactantes aniónicos que desactivan muchos conservadores.

Los emulsificantes no iónicos - especialmente los etoxilados o propoxilados - les quitan su efectividad a los parabenos y a otros antimicrobianos fenólicos, a los compuestos cuaternarios de

amonio, al ácido sórbico, etc. (efecto antagónico).

La neutralización por enlaces químicos de los surfactantes aniónicos destruye la actividad de los germicidas catiónicos y mercuriales; por analogía, los surfactantes catiónicos reducen la actividad bactericida y bacterioestática de los conservadores catiónicos (cuaternarios de amonio).

Así mismo, la lanolina, metil celulosa, lecitina, caolín, óxido de zinc y algunos polímeros grandes con propiedades mucilaginosas como son: goma de tragacanto, PVP, metil celulosa y carboximetil celulosa, debido a su reactividad química o física, incluyendo su naturaleza absorbente, reducen la actividad de muchos conservadores.

Aditividad.- Los conservadores que pertenecen a los mismos grupos químicos o que tengan mecanismos de acción idénticos, al mezclarse o combinarse producen aditividad.

Sinergismo.- Los conservadores de diferentes clases químicas cuando se combinan, tendrán una actividad mayor que si sumáramos las actividades de cada uno de ellos por separado. Deben tener diferentes modos y sitios de acción. Ejemplo: Cuando los cuaternarios de amonio que son desorganizadores celulares y disminuyen la tensión superficial, se combinan con el meta cresol permiten la entrada de éste último a la célula.

4.-La introducción de envases de plástico ha incrementado los problemas de incompatibilidad. Ciertos tipos de PVC (Cloruro de polivinilo) pueden inactivar a los germicidas fenólicos, mientras que el polietileno, en especial media y baja densidad, es

permeable a los conservadores solubles en aceite, incluyendo fenoles y parabenos. El poliuretano, especialmente el tipo éster, reacciona con algunos germicidas y puede reducir la actividad de los conservadores fenólicos y cuaternarios de amonio.

Por todo esto, es de suma importancia aprender que las pruebas de pantalla tienen poco valor, ya que un sistema conservador debe probarse en el producto cosmético final.

Por supuesto que también es posible mejorar un sistema conservador mediante ciertos componentes del cosmético, por ejemplo el alcohol y propilen glicol, ya que a menudo la presencia de alcohol en concentraciones del 4% al 6% ha incrementado la efectividad de algunos conservadores. El propilen glicol aumenta la actividad de los parabenos. En general los materiales (como: glicerina, sorbitol, hexilen glicol y butilen glicol) que incrementan los coeficientes de partición de los conservadores causan una pérdida de actividad y los que disminuyen los coeficientes de partición provocan un aumento en la actividad de éstos. Se han reportado formulaciones que contienen entre 10%-20% de propilen glicol que no necesitan conservador.

5.- El conservador es más efectivo cuando se disuelve en la fase acuosa ya que así no migrará hacia la fase oleosa. En una emulsión el conservador se parte entre las fases, dependiendo de su solubilidad relativa entre ellas. Un conservador como el metil paraben puede formularse disolviéndolo en la fase acuosa pero al estar en reposo por lo general, migrará hacia la fase oleosa la cual desafortunadamente se pueda ver favorecida hasta 10 : 1 con

respecto a la acuosa. El problema de la migración del conservador se complica debido a que cada ingrediente de una fase afecta la solubilidad del microbicida o conservador en esa fase. Solamente mediante pruebas microbiológicas del producto terminado a lo largo de períodos extensos de almacenamiento se puede probar que la migración del conservador no va a ser un problema.

6.- En formulaciones más complejas w/o u o/w el conservador se distribuye así mismo de acuerdo con su coeficiente de partición. Esta distribución puede ser modificada por la presencia del emulsificador. Los conservadores con bajo coeficiente de partición aceite - agua son los preferibles, ya que de otro modo el conservador se encontrará en la fase oleosa y no desempeñando su función.

En sistemas emulsificantes, el coeficiente de partición puede afectar la actividad del conservador de las siguientes formas:

- Por disociación constante del conservador.
- Por cierta cantidad del conservador no disociada entre las fases del producto.
- El pH del producto.
- Volúmenes relativos entre las fases.
- Concentración mínima no disociada del conservador en la fase acuosa necesaria para la acción conservadora.

7.- El conservador debe ser efectivo en el pH del producto y retener esta actividad aunque este varíe con el tiempo.

En general, son pocos los conservadores que son efectivos en

un rango alcalino en comparación con los que lo son en un rango ácido.

En estudios de preservación se ha probado que no es el pH el mayor responsable de la acción antimicrobiana sino la actividad intrínseca del conservador. Albert demostró que la actividad antiséptica de los ácidos débiles es debida principalmente a la molécula no disociada. El equilibrio entre ácido disociado y no disociado es una función del pH. Para los ácidos que actúan en la forma disociada, cuanto más alto es el valor de pKa mayor es la eficacia del ácido como conservador.

Aalto y Bandelin señalaron que la actividad de los ésteres del ácido para - hidroxibenzoico casi no es afectada por el pH. El valor del pKa del metil parabeno es de 9.5 en la zona alcalina.

Es conveniente tener presente que al efecto del pH sobre el conservador mismo, modificando su disociación y por ende su actividad, debe sumarse la toxicidad propia de los iones hidrógeno e hidroxilo. Cualquier solución con pH menor de 2 o mayor de 12 se preserva por sí sola y habitualmente es de rápida acción bactericida. En general son pocos los conservadores que son efectivos en una escala de valores alcalinos en comparación con los que son en una escala ácida.

A ciertos pHs, muchos conservadores se vuelven menos eficaces o menos estables. Los cuaternarios de amonio son más efectivos a pHs mayores de 7 mientras que los compuestos de mercurio forman un precipitado insoluble a un pH mayor de 8.5, el Bronopol se degrada a pHs alcalinos.

Los conservadores ácidos tales como el ácido sórbico, el benzoico y el dehidroacético se convierten en sales a medida que aumenta el pH. Mientras más fuerte es el ácido más fácilmente se convierte en su sal y, desafortunadamente, esta forma es inactiva por lo general en contra de los microorganismos. Los parabenos son derivados del fenol así que también son ácidos débiles. A un pH de 7, alrededor de dos terceras partes del parabeno funciona como conservador y a pH de 8.5 solo la mitad sigue en forma activa.

8.- El tiempo es otro factor. Mientras más largo es el tiempo de contacto, más organismos morirán. Para propósitos de conservación normalmente no es necesario tener una matanza rápida, y el conservador tiene que ser efectivo durante toda la vida de anaquel esperada; además, debe eliminar cualquier contaminación accidental que ocurra durante su uso. Se ha observado que la actividad del conservador decrece con el tiempo o con la vida del producto debido a:

- a) Interacción gradual del conservador con los ingredientes del producto.
- b) Cambio de distribución entre las fases.
- c) Interacción con los contaminantes.
- d) Pérdida gradual con el empaque.

Este tipo de datos se pueden obtener haciendo pruebas en productos que duren en almacen por tres años o más; los conservadores deberán controlarse cuidadosamente en el curso de los exámenes rutinarios de estabilidad.

Existe la presencia de dos fenómenos:

a).- Una fase latente inicial debido al tiempo requerido por el conservador para adsorberse en la superficie del microorganismo.

b).- Un período de reducción del número de microorganismos el cual se conduce como una reacción de primer orden, debido a la presencia de gérmenes resistentes.

9.- Una propiedad básica que se debe probar en todo conservador es su capacidad para producir reacciones alérgicas que representen un peligro para el usuario normal. En realidad, no hay ningún conservador que sea totalmente no alérgico o sensibilizante cuando un número de personas se exponen repetidamente a él.

En resumen, los parabens han sido reportados como sensibilizadores potenciales, así como los fenólicos, F - 37, donadores de F - 37 (estos últimos tienen menos potencialidad de irritación tal vez porque la cantidad de F - 37 liberada es muy poca), debido a su uso tan amplio.

10.- Otro factor de importancia en la acción conservadora es el número de microorganismos; mientras más haya, más tiempo le tomará al conservador eliminarlos. Una contaminación masiva puede acabar o desgastar cualquier sistema de conservación.

11.- Ya que la temperatura de almacenamiento puede variar, se deben hacer pruebas para el conservador a 40° C y a temperatura de refrigerador; se debe observar que tipos de problemas se presentan en la preservación del producto. Rara vez se toma en cuenta que el producto va a ser almacenado a temperaturas altas o bajas con

respecto a la temperatura de su desarrollo. Por lo cual es muy importante tomar en cuenta el impacto de la temperatura sobre el sistema conservador.

12.- Un factor importante es el costo del conservador.

13.- Interacciones con partículas sólidas.- se han reportado pérdidas de conservadores en presencia de partículas sólidas debido a una adsorción; ejemplo, cloruro de cetil piridinium y cloruro de benzalconio por talco y caolín.

Pruebas químicas bacteriológicas indican que una porción queda adsorbida irreversiblemente. Barr y colaboradores describen la inactivación de conservadores catiónicos por barro anónico.

El talco reduce la actividad del metil paraben y alcohol bencílico en un 90%. Hugo y Wilson reportan que la *Pseudomona aeruginosa* se multiplica fácilmente en agua que ha sido agitada con talco, lo cual es de suma importancia en la preparación de aguas aromáticas. Lachman reporta que el cloruro de benzalconio, cloruro de cetilpiridinium forman complejos insolubles con colores certificados, provocando la inactivación de los conservadores.

No solamente los conservadores se adsorben sobre las partículas sólidas sino también los microbios como la *E. coli* y otros.

14.- Al diseñar una formulación es importante tomar en cuenta:

- a).- La estabilidad que posea la estructura química del conservador que se está utilizando.
- b).- El carácter ácido-base del antimicrobiano.

c).- pH del producto cosmético.

B) Mecanismo de acción de los conservadores.

Los conservadores interfieren con el crecimiento microbiano, multiplicación o metabolismo, por alguno de los siguientes mecanismos:

- 1.- Modificación de la permeabilidad de la membrana celular.
- 2.- Acción enzimática competitiva en algunas proteínas celulares.
- 3.- Oxidación o reducción de los constituyentes celulares.
- 4.- Hidrólisis.
- 5.- Interferencia con sus metabolitos esenciales (Deaminación, descarboxilación, fosforilación, difosforilación).

C) Posible mecanismo de acción de algunos conservadores.

- | | |
|----------------------------|--|
| 1.- Acido benzoico | Acción a nivel de membrana, competencia con coenzimas. |
| 2.- Acido bórico | Inhibición de la fosforasa en anaerobios. |
| 3.- Parahidroxibenzoatos | Acción a nivel de membrana, competencia con coenzimas. |
| 4.- Fenoles | Acción en la membrana. |
| 5.- Cuaternarios de amonio | Acción lítica en la membrana. |
| 6.- Alcoholes | Acción en la membrana. |

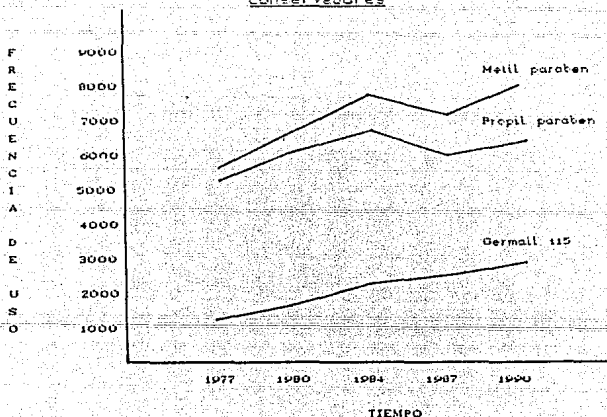
- 7.- Acido Dehidroacético Inhibición del sistema ciclo fosforasa en aneróbios.
- 8.- Acido Salicilico Acción a nivel de membrana, competencia con coenzimas y con el metabolismo de aminoácidos.
- 9.- Acido Monocloroacético Acción a nivel de membrana.
- 10.- Acido Sorbico En organismos catalasa positivos oxidación supresiva del fumarato.
- 11.- Sulfitos Inactivación de puentes - S - S - en porciones proteínicas y enzimas.
- 12.- Formol Reacciona con la porción proteica de las enzimas dependiendo del pH y de los grupos - SH.
- 13.- Mercuriales Reacciona formando mercaptanos.

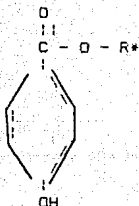
D) Frecuencia de uso de los conservadores en las fórmulas cosméticas según la FDA.

En 1977 la FDA informó la frecuencia de uso de 125 ingredientes conservadores y lo reportó nuevamente en 1990. Los tres conservadores más usados en las compañías cosméticas de los EEUU son: metil paraben, propil paraben y Germall 115 como se muestra en la siguiente tabla:

<u>Conservador</u>	<u>Frecuencia de uso.</u>				
	<u>1977</u>	<u>1980</u>	<u>1984</u>	<u>1987</u>	<u>1990</u>
Metil paraben	5,673	6,785	7,594	7,306	7,754
Propil paraben	5,327	6,174	6,796	5,030	6,343
Germall 115	1,254	1,684	2,315	2,497	2,747

Grafica de aumento en la frecuencia de uso de los principales conservadores



A) Esteres del Acido - p - hidroxibenzoico.

R* : Puede ser un grupo alquilo o bencilo

Estos ésteres, llamados por lo común parabenos, son ampliamente usados en preparaciones farmacéuticas, cosméticos y artículos de tocador, fueron desarrollados en Europa por Sabalitschká. Son bacteriostáticos y fungistáticos, poco solubles en agua; más efectivos en pH ácido.

El éster metílico es en particular efectivo contra bacterias aunque menos efectivo contra hongos, pero a medida que se incrementa la longitud de la cadena alquílica, la actividad de los ésteres aumenta, volviéndose tan eficaces para frenar el desarrollo de bacterias como de hongos. Huppert probó los ésteres n - alquilo hasta C₁₆ y encontró la mayor acción fungicida con los grupos hexilo y heptilo. Se demostró que la actividad antibacteriana aumenta con el tamaño de la molécula. Ya que los ésteres son compuestos lipofílicos, su sitio de acción probablemente sea la membrana celular, sin descartar un efecto producido sobre sistemas

enzimáticos por acción competitiva.

Harry y Nipa laboratories Ltd. publicaron información sobre las diferentes solubilidades en aceite y agua y la distribución resultante entre las fases de una emulsión; ya que constituyen factores importantes en la determinación del nivel de utilización de estos ésteres.

Solubilidades por ciento P/P de los parabenos más usados:

<u>Radical</u>	<u>Nombre químico</u>	<u>Fórmula empírica</u>
CH ₃	Metil p- hidroxibenzoato	C ₈ O ₃ H ₈
C ₂ H ₅	Etil p- hidroxibenzoato	C ₉ O ₃ H ₁₀
C ₃ H ₇	Propil p- hidroxibenzoato	C ₁₀ O ₃ H ₁₂
C ₄ H ₉	n- butil p- hidroxibenzoato	C ₁₁ O ₃ H ₁₄
C ₆ H ₅	Bencil p- hidroxibenzoato	C ₁₄ O ₃ H ₁₂

<u>Peso molecular g</u>	<u>Punto de fusión °C</u>	<u>Aqua 20°C</u>	<u>Etanol</u>
152.15	125 - 128	0.25	35
166.18	115 - 117	0.07	40
180.20	95 - 98	0.032	40
194.23	68 - 69	0.0225	70
228.25	110 - 112	----	---

<u>Propilen glicol</u>	<u>Aceite de maní</u>	<u>Lanolina 70°C</u>
20	2.5	8
15	1.0	30
20	1.4	30
40	5.0	> 100
--	4.5	60

Los niveles reales del éster en la fase acuosa adquieren niveles de significación cuando se comparan con las concentraciones inhibitorias mínimas (CMI). Los parabenos se unen en diferentes

grados a macromoléculas, coloides, detergentes no iónicos y otros agentes emulsificantes. Barkley proporciona información sobre esto:

<u>Macromolécula</u>	<u>% fijación de</u>	<u>% fijación de</u>
<u>2% P/V.</u>	<u>metil paraben</u>	<u>propil paraben</u>
Gelatina	8	11
Metilcelulosa	9	13
Poliétilen glicol 4000	16	19
Tween 20	57	86
Tween 80	57	90
Polivinilpirrolidón	22	36

Los parabenos son moderadamente antioxidantes y por ello se usan en la conservación de aceites vegetales. Suelen denominarse como compuestos fenólicos en algunas clasificaciones.

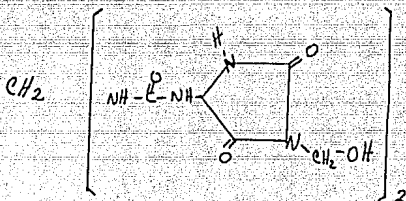
En los últimos años se han venido usando las sales de sodio por su solubilidad en agua fría. Son útiles en la preservación de materiales y productos acuosos sensibles al calor. El mejor método de incorporación es la preparación de un concentrado al 40% en agua fría disolviendo 2 partes del mismo en 3 partes de agua a temperatura ambiente y agitando constantemente, sin calentamiento. El concentrado debe usarse el mismo día de su preparación. De este concentrado se añade la cantidad necesaria lentamente al material que hay que conservar, sin dejar de agitar.

Ya que las soluciones de este tipo son alcalinas, es preciso hacer una pequeña corrección de pH con ingredientes ácidos. Esto se suele efectuar después de la incorporación del conservador. El producto no debe calentarse después de la adición de las sales sódicas.

El empleo de los conservadores solubles en agua fría es, a veces, ventajoso en muchas soluciones y también para la conservación de productos de dos fases de reacción neutra, ya que después de la incorporación, el reparto dentro de la fase acuosa ocurre debido a la alta solubilidad del conservador en agua.

B) GERMALL 115

Germall 115 .- Es un derivado de un compuesto heterocíclico. Su nombre adoptado por la CTFA es Imidazolidinil Urea. La fórmula molecular es: $C_{11}H_{16}N_4O_6 \cdot H_2O$. Peso molecular 406.33, su estructura es:



Como se ha establecido anteriormente, después de los parabenos el conservador más usado es el Germall 115. En la literatura se le ha reportado como un conservador no tóxico, de amplio espectro, de efecto sinérgico con otros conservadores. Soluble en agua y activo a un pH de 4 a 9. Esta considerado como un donador de formaldehído. El nivel de concentración al cual se usa es de 0.05% - 0.5%.

El mecanismo de acción aún no está del todo comprendido, pero se supone que se produce una interferencia del metabolismo del microorganismo.

Es de buena actividad contra las bacterias y moderada contra hongos y levaduras; debido a ésto, es recomendable combinarlo con parabenos para obtener un espectro de actividad más amplio.

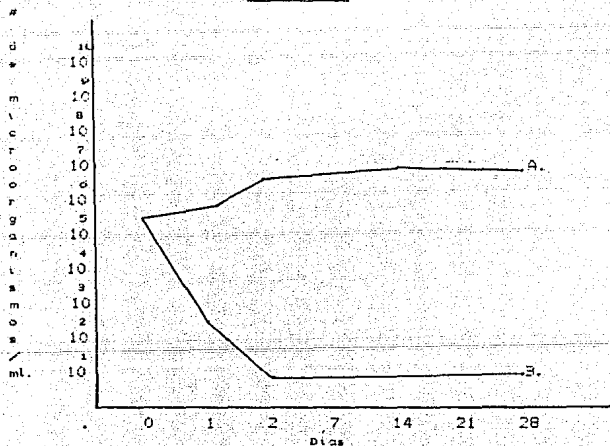
Se reporta en la literatura que éste compuesto es prácticamente compatible con la mayoría de los ingredientes cosméticos. No interactúa con colorantes o fragancias y retiene su actividad antimicrobiana en presencia de proteínas, emulsificadores no iónicos, macromoléculas, etc. Es soluble en agua, lo cual facilita su incorporación en las formulaciones cosméticas, ya que puede añadirse como polvo o como solución concentrada. Dado que el Germall 115 es insoluble en fases de aceite, por lo general menos de un centésimo de uno por ciento, no emigra hacia la fase aceitosa, sino que se queda en la fase acuosa donde pueden crecer las bacterias.

Es estable ya que puede calentarse a 100 ° C sin cambio alguno y a temperaturas de emulsificación de alrededor de 70 C no causa ningún problema en la formulación.

El Germall 115 es activo en contra de las bacterias, incluyendo aquellos microorganismos de mayor preocupación entre las gram negativas. En un estudio en una loción modelo, publicado en 1973 por la Subcomisión de Preservación Microbiana CFTA, un sistema preservativo de metil parabeno 0.2% con propil parabeno 0.1% pudo matar levaduras y mohos pero no fue capaz de eliminar la bacteria gram negativa *Ps. aeruginosa*. En cambio la loción que fue preservada con Germall 115 0.3% , metil parabeno 0.2% y propil parabeno 0.1% tuvo la preservación adecuada.

Como puede observarse en la siguiente gráfica, las Pseudomonas aeruginosas que se introdujeron en la loción que contenía metil parabeno y propil parabeno siguieron creciendo vigorosamente a lo largo del periodo de prueba de 28 días. Cuando se reforzó el sistema preservativo con la adición de Germall 115 0.3% la loción tuvo la preservación adecuada. Al tener presente al Germall 115 la loción pudo eliminar a la Pseudomonas aeruginosa en dos días.

Gráfica de la prueba rato realizada a las lociones con Pseudomonas aeruginosa



Loción A preservada con metil parabeno 0.2 % + propil parabeno 0.1 % .

Loción B preservada con Germall 115 0.3 % + metil parabeno 0.2 % + propil parabeno 0.1 % . Este sistema conservador es el que se ha usado con mayor éxito en varios productos cosméticos.

El Germall 115 da excelentes resultados cuando se combina con metil y propilparabeno en una gran variedad de productos cosméticos.

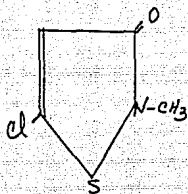
La contaminación de los cosméticos con Pseudomonas es una de las principales preocupaciones de la industria debido a que dichos microorganismos están tan distribuidos en la naturaleza, son muy adaptables y resistentes a la mayoría de los antimicrobianos. La Pseudomona aeruginosa se le ha descrito como la bacteria gram negativa capaz de provocar daños irreparables a los ojos, ya que por ejemplo, la irritación de los ojos provocada por un shampoo contaminado es suficiente, en algunos casos, para permitir el desarrollo de una infección por ésta bacteria.

No sólo se ha reportado que se ha tenido resultados favorables con el uso del Germall 115 y los parabenos sino que también se han usado otras combinaciones con ácido sórbico, ácido dihidroacético, cuaternarios de amonio y otros conservadores.

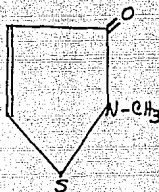
C) KATHON CG

El ingrediente activo del KATHON CG es una mezcla de dos isotiazolinonas cuya nomenclatura en el sistema IUPAC es 5 cloro-2 metil- 4 isotiazolin 3-ona y 2 metil-4 isotiazolin 3-ona. El nombre adoptado por la CTFA es Metil cloro isotiazolinona y metil isotiazolinona.

5-Cloro-2 Metil-
4-isotiazolin-3-ona



2-Metil-4-Isotiazolin
-3-ona



Este nuevo agente antimicrobiano posee una composición química como se muestra a continuación:

Ingredientes activos:

5 cloro 2 metil 4 isotiazolin 3 ona	1.15%
2 metil 4 isotiazolin 3 ona	<u>0.35%</u>
	1.50%

Ingredientes inertes:

Sales de magnesio	23.0%
Agua	<u>75.5%</u>
	98.5%

Es muy soluble en agua, menos soluble en alcoholes, glicoles y otros solventes orgánicos hidrofílicos. Se recomienda usar en una concentración de 0.02 - 0.1% (3 - 15 ppm de ingrediente activo). Se puede usar a concentraciones más altas como 0.15% , lo cual da una protección adicional pero puede producir sensibilización.

Compatibilidad:

Biológica y físicamente es compatible con surfactantes aniónicos, no iónicos y catiónicos ; y proteínas. El ingrediente activo puede ser inactivado por concentraciones altas de aminas.

Estabilidad:

Es estable a temperatura ambiente aproximadamente un año y 6 meses a 50° C. Durante la manufactura de productos cosméticos, el Kathon CG puede adicionarse aún a 100° C, sin que haya pérdida del ingrediente activo.

Posee una buena actividad microbicida contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, hongos y levaduras. No sólo se ha usado en productos cosméticos, sino también en la preservación de materias primas, incluyendo surfactantes en una concentración de 0.025% (3.8 ppm de ingrediente activo).

Propiedades toxicológicas:

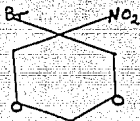
Existen varios estudios en los cuales se presenta al Kathon CG como un agente antimicrobiano seguro, siempre y cuando se use a

las concentraciones indicadas por el proveedor Rohm and Haas Company. El material en si es corrosivo, puede causar danos a los ojos, quemaduras a la piel, es alergénico. No es biodegradable, por lo cual puede causar dano a la vida marina. Debido a lo anteriormente citado, se le debe manejar con sumo cuidado, usando las recomendaciones proporcionadas por el proveedor.

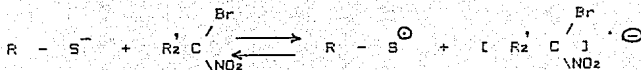
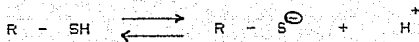
Un reporte fechado el 4 de Febrero de 1996 presentado por The Department of Occupational Dermatology of Sweden mostró al Kathon CB como un sensibilizador en potencia debido al uso tan extendido que tiene éste en Europa. No se prohibió su uso, se pidió se realizaran mayores estudios.

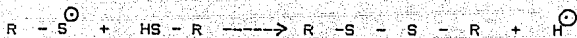
D) BRONIDOX L

Este agente antimicrobiano fue desarrollado por Henkel & Cie. GmbH. Su nombre químico es 5-Bromo-5-Nitro-1,3 dioxano en solución en 1,2 propilen glicol. $C_4 H_6 Br N O_4$.
P.M. 212.0



Es un material estable a la luz y calor arriba de 50 C , así como a pHs entre 5 y 9. El modo de actuar de éste producto no se basa en el desdoblamiento de formaldehído, sino que puede calificarse como "reacción de oxidación" de los grupos tiol de ácidos mercaptoamínicos. Stratton y Manson explican el efecto de compuestos alfa-bromonitro sobre microorganismos según el siguiente esquema:





Una de las ventajas que ofrece este conservador es que se puede usar a temperatura ambiente.

Posee un alto grado de actividad en contra de bacterias gram negativas y gram positivas, hongos y levaduras, pero especialmente contra la *Pseudomona aeruginosa*. Las concentraciones recomendadas de este conservador van de 0.02 a 0.05% .

Después de realizarse varias pruebas en diferentes productos, se encontró que el Bronidox L es compatible con diferentes tipos de emulsificantes, tenso-activos y componentes oleosos, así como extractos vegetales y animales. A temperaturas elevadas y tiempos prolongados de almacenamiento, no se produjeron cambios de olor, color ni consistencia en dichos productos cosméticos.

El producto es recomendado por el fabricante para la conservación de shampoos y preparados de baños de espuma. Especialmente para estos campos, existen en la Literatura extensas pruebas de compatibilidad, dermatológicas y toxicológicas.

E) EUXYL K 400

El nombre adoptado por la CTFA es Metil dibromo Glutaronitrilo Fenoxietanol.

Este conservador puede ser usado en productos cosméticos y de tocador. Este producto es un preparado líquido de 1,2-dibromo-2,4-dicianobutano en 2-fenoxietanol.

Posee un amplio espectro antimicrobiano contra bacterias gram negativas y grampositivas, hongos y levaduras. No libera formaldehído. Este agente conservador fue desarrollado muy recientemente por Calgon Corp. subsidiaria de Merck Co. y en su Literatura se le reporta como un producto toxicológicamente seguro. Es compatible con la mayoría de los componentes cosméticos a excepción de los surfactantes no iónicos y proteínas. Puede ser usado como agente conservador único o en combinación con otros agentes antimicrobianos; e incluso ser adicionado al producto final a temperaturas abajo de 50°C.

Es compatible con materiales como PVC, polietileno, polipropileno, teflón, vidrio. Se ha observado corrosión en las tacas de aluminio de contenedores de crema; así como interacción con algunos pigmentos, por lo cual se recomienda que en el caso de formulaciones altamente pigmentadas se use éste conservador en mayor concentración.

A 20° C, 100g de agua disuelven 0.4g de Euxyl K 400. Es soluble en solventes polares como 1,2-propilen glicol, propanol, acetona. Poco soluble en glicerina y sorbitol.

La CTFA (The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association) publicó en 1973 unos lineamientos para límites microbianos en productos cosméticos y de tocador. El comité (CTFA) está basado en recomendaciones sobre:

- 1) El grado variable del riesgo potencial relativo al uso designado.
- 2) En los standards existentes o recomendaciones para productos de otras áreas por ejemplo: Alimentos y Farmacéuticos.
- 3) En conocimientos de factores ambientales.
- 4) Límites microbiológicos de las compañías.
- 5) Variación inherente en pruebas microbiológicas.

Mientras un standard es una regulación administrativa con la fuerza de ley, un límite es una sugerencia de un número máximo aceptable de microorganismos, determinado por métodos prescritos. La guía de la CTFA se preparó para ofrecer ayuda a los fabricantes para juzgar la calidad microbiológica de sus productos. Los limitantes no son el único criterio para la aceptabilidad: el fabricante deberá tomar en cuenta la naturaleza específica de su producto, estableciendo criterios microbiológicos para su seguridad.

El fabricante tiene la responsabilidad de elaborar un producto adecuadamente preservado.

Los límites recomendados para los diferentes tipos de cosméticos, están basados en un procedimiento de cuenta en placa standard.

Criterios específicos:

Productos para bebé:

no más de 500 colonias por g. o por ml.

Productos usados alrededor de los ojos:

no más de 500 colonias por g. o por ml.

Productos orales:

no más de 1000 colonias por g. o por ml.

Todos los demás productos:

no más de 1000 colonias por g. o por ml.

Estas cifras establecen, además, que debe haber total ausencia de gérmenes patógenos.

Para realizar el análisis microbiológico correspondiente y establecer standards se deben considerar los siguientes factores:

- a.-Cuenta total de bacterias incluyendo hongos y levaduras.
- b.-Naturaleza de la flora microbiana.
- c.-Naturaleza de la materia prima.
- d.-Naturaleza del producto final.

Son las regulaciones o principios básicos y fundamentales sobre las cuáles debe cimentarse la Manufactura o Producción y Empaque de los productos, de tal forma que cada uno de ellos tenga la calidad requerida.

Personal: Todos los empleados involucrados en las "Operaciones de Manufactura" deben recibir orientación sobre el uso de GMP , haciéndoles comprender que la Calidad es responsabilidad de todos y que cada persona es responsable de la Calidad de su propio trabajo.

1.-El personal y la contaminación:

Una de las principales fuentes de contaminación somos nosotros mismos; ya sea debido a la flora normal de nuestro cuerpo o al no utilizar adecuadamente las GMP.

2.-Prácticas higiénicas:

a) Cofias, cubrebocas y guantes deben estar disponibles en todas las áreas de Producción para así proteger la Calidad de los materiales que se manejen.

b) Batas o uniformes limpios.

c) El personal debe lavarse las manos antes de iniciar el trabajo, después de los descansos y después de usar los sanitarios. Por ello, los lavabos deben estar provistos con surtidores de

jabón o detergente y toallas desechables.

d) Todo el personal que esté en contacto directo con el producto debe ser sometido a un exámen médico periódico (Tarjeta de salud).

e) Durante las operaciones de manufactura no pueden entrar visitantes a las áreas de Producción. Los aseadores, mecánicos, electricistas, etc. que tengan que trabajar en dichas áreas deberán observar las mismas reglas, precauciones y prácticas que el personal de Manufactura.

3.- Edificios e Instalaciones:

1) Espacio.- Los edificios e instalaciones deben mantenerse limpios y libres de escombros. Colocar ordenadamente equipo , materiales, productos y materias primas para así optimizar el flujo de éstos y evitar cualquier confusión. Cualquier exceso de éstos mismos debe retirarse del área, además de que deben conservarse en condiciones sanitarias.

Los edificios e instalaciones deben poseer iluminación, ventilación y resguardo adecuados contra los elementos y el medio ambiente y así controlar lo mejor posible la humedad y temperatura, reduciendo de ésta forma la contaminación de materias primas, materiales, productos, etc.

2) Paredes, pisos y techos.- Las instalaciones y edificios deben estar contruidos de tal forma que no entren animales ni insectos. Deben ser lisos, libres de rajaduras y hendiduras para que se efectuen fácilmente las operaciones de limpieza.

3) Instalaciones sanitarias.-Deberán proveerse vestidores, sanitarios, duchas y lavabos.

4) Tráfico y puertas.-El tráfico en las áreas de manufactura debe ser reducido al mínimo ya que la gente no sólo suelta microorganismos de su cuerpo, sino que los dispersa. Las puertas son un factor importante en el control del medio ambiente.

El manejo, preparación y análisis de las muestras fue realizado de acuerdo a la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, Cuarta Edición, México 1974, pags. 154 - 163. " Método de placa ", por lo que sólo se darán los resultados obtenidos.

1.- Producto analizado: Shampoo para bebé.

Formulación.

<u>In ingrediente</u>	<u>Cantidad g.</u>
Estocomida LD 105 (Amida linoleica).	8.00
Estocogel (Diesterato de PEG. 6000).	5.00
Ingsanol LESS 30 (Lauril eter sulfato de sodio, detergente aniónico).	140.00
Estocopol SRC 212 (Sulfosuccinato disódico de monoetanolamida de coco, detergente aniónico).	24.00
Estocopon AMB 45 (Cocamido propil betaina).	64.00
Cyasorb UV 9 (Benzofenona).	1.00

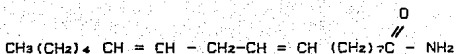
Sequestrene (Sal tetrasódica del EDTA).	0.20
Na Cl	6.00
Acido cítrico	0.75
Perfume	2.50
Color	0.06
Sistema conservador	Ver estudio realizado.
Agua	cbp 1000.00

Materias primas:

Amida linoleica .- Es la amida alifática del ácido linoleico. Las amidas y etanolamidas de ácidos grasos son buenos agentes acondicionadores, ya que cubren el cabello con una pequeña cantidad de material, aumentando sus características de manejabilidad y al mismo tiempo lo lubrica dejándolo más suave y con cuerpo.

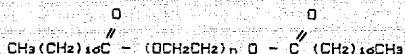
Usualmente se les prepara por reacción de una mol de una amina con una mol de ácido graso. Estas alcanolamidas están siendo sustituidas por las superamidas, las cuáles tienen mayor capacidad para dar altas viscosidades.

Fórmula química:



Diesterato de PEG. 6000. - Es el diesterato de PEG. del ácido esteárico. Es un buen espesante. Este tipo de agentes no es fácil de seleccionar ya que dentro de la misma formulación existen otros ingredientes que nos ayudan a obtener una viscosidad adecuada, por ejemplo las amidas. Un exceso de éste tipo de materias primas ocasiona que el producto forme una película antiestética sobre el cabello.

Fórmula química:



Cuando n es igual a 150.

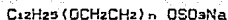
Lauril éter sulfato de sodio. - Los alcoholes grasos sulfatados y alcoholes grasos etoxilados sulfatados se usan en las formulaciones de shampoos. Pertenecen a los tensoactivos aniónicos. Según Baker reúnen los siguientes requisitos:

- a.- Buena detergencia.
- b.- Buena espuma inicial en presencia de sebo, en aguas duras y blandas.
- c.- Dan espuma cremosa con buen cuerpo y textura. Además pueden estabilizarse con aditivos de bajo costo.

Sin embargo, tienen la desventaja de que desengrasan excesivamente al cabello dejándolo seco y poco manejable. Son muy irritantes.

El detergente aniónico más usado es el Lauril éter sulfato de sodio. Tiene la ventaja de su bajo costo y suavidad.

Fórmula química:



n .- Usualmente es igual a 2 ó 3. Se ha reportado en la Literatura que los productos en donde n es igual a 3 tienen excelentes propiedades espumantes.

Sulfosuccinato disódico de monoetanolamida de coco.- Los sulfosuccinatos tienen gran actividad tensoactiva. Presentan una baja toxicidad e irritabilidad. Tienen relativamente un bajo costo, pero no son buenos agentes espumantes. Su importancia radica en que son menos irritantes para los ojos y la piel, en comparación con los demás detergentes; por lo cual se usan en productos para bebés. Pertenecen a los detergentes aniónicos.

Cocamido propil betaina.- Son detergentes anfóteros, la carga varía de acuerdo con el pH del sistema. Se han descrito como reemplazantes de los clásicos alquil sulfatos y alquil eter sulfatos, para disminuir la irritación y ardor que producen éstos últimos en los ojos. Varias patentes cubren el empleo de combinaciones de aniónicos y anfóteros tipo betaina e imidazolina, para mejorar el relativo bajo poder espumante de los anfóteros. Se emplean fundamentalmente en la formulación de shampoos no irritantes.

La cocamido propil betaina es el zwitterion (sal interna).

agua dura. Además, impiden que se formen películas antiestéticas sobre el cabello después de darle shampoo y enjuagarlo con agua dura.

Otros aditivos que entran en esta formulación son:

Cloruro de sodio.- Se usa para ajustar viscosidad.

Acido cítrico.- Esta materia prima tiene una doble función, ya que se utiliza para obtener el pH adecuado y como agente secuestrante.

Perfums y color se escogieron de acuerdo al producto.

Sistema conservador:

Para preservar esta formulación se probaron varios conservadores entre los cuales se encuentran tres de los más frecuentemente usados en las fórmulas cosméticas según la FDA. (Nipagin, Nipasol y Germall 115), así como varios de los más recientes; entre ellos el Kathon CG. Las concentraciones que se usaron de éstos conservadores fueron las recomendadas en la literatura combinadas con la experiencia del asesor y del realizador del trabajo. Las pruebas más importantes están resumidas en el cuadro adjunto.

2.- RESULTADOS.

Producto : Símico para bebé.

Muestra	Conservador	% Conservador	Cuenta total incluyendo hongos y levaduras				Medios selectivos		
			4	7 (días)	14	28	MC. Carkey	Vogal y Johnson	Base de agar Ostrinida
a)	Sin conservador	—	PI	PI	PI	PI	+	+	+
b)	Nipagin + Nipsol	0.3 + 0.3	PI	PI	PI	PI	+	-	+
c)	Oemall 115 + Nipagin	0.3 + 0.2	PI	PI	PI	PI	+	-	+
d)	Oemall 115 + Nipagin + Nipsol.	0.3 + 0.2 + 0.1	4870 col/g. PI	PI	PI	PI	+	-	+
e)	Kathon GG	0.02	00 col/g.	20 col/g.	—	—	-	+	-
f)	Kathon GG	0.1	10 col/g.	—	—	—	-	+	-

Tinción muestras a, b, c y d. : Gram negativos.

Presuntivamente se trata de *Psithium aeruginosa*.

Tiempo: Días después de la preservación del producto.

PI : Placa Inoculada

3.-Conclusiones:

Después de examinar los parámetros que tienen que ser tomados en cuenta al escoger un sistema conservador, resulta imposible detallar toda la complejidad de la interacción que existe entre el producto y el conservador y entre el conservador y los microorganismos. Muchas de estas interacciones aún no están completamente comprendidas y falta por descubrir muchas otras.

Las siguientes muestras fueron rechazadas por contener un alto índice de contaminación:

Muestra a.- Blanco positivo. Muestra sin conservador.

Muestra b.- Nipagin 0.3% + Nipazol 0.3% .

Muestra c.- Germall 115 0.3% + Nipagin 0.2% .

Muestra d.- Germall 115 0.3% + Nipagin 0.2%

+ Nipazol 0.1% .

Esta contaminación puede deberse a los siguientes factores:

La interacción del Nipagin con las moléculas aniónicas de los detergentes Ingsanol LESS 30 y Estocopol SBC 212.

La formación de ligaduras entre el Nipagin y PVC (envase en el que fueron almacenados durante el presente estudio), ya que a 45°C se pierde un 25% y a 60°C se pierde 50% de dicho conservador.

La incompleta disolución del Nipagin durante el proceso de elaboración.

No se obtuvo el efecto sinérgico de la combinación del Germall 115 + Nipagin + Nipazol como teóricamente se esperaba.

Las muestras que se presentarán a continuación fueron aprobadas:

Muestra e.- Kathon CG 0.02% .

Muestra f.- Kathon CG 0.10% .

A dichas muestras se les practicó la prueba de Draize, resultando ambas como no irritantes, lo cual es de suma importancia ya que es un producto para bebés.

Por lo anteriormente observado podemos concluir que el Kathon CG es el conservador adecuado a ésta formulación.

Por último se debe tomar en cuenta que la teoría y la práctica son esenciales pero jamás una podrá sustituir a la otra.

Antisepsia: Aplicación de sustancias antimicrobianas o antisépticos al tratamiento o profilaxis de una infección local.

Antiséptico: Sustancia con actividad bacteriostática.

Asepsia: Conjunto de medidas destinadas a impedir toda contaminación bacteriana.

Aséptico: Caracterizado por la falta de microorganismos patógenos.

Bactericida: Compuesto que tiene la propiedad de matar las bacterias.

Bacteriostático: Compuesto que tiene la propiedad de inhibir la multiplicación bacteriana; ésta se reanuda en cuanto se retira el agente.

CFU (Concentración mínima inhibitoria): Es la cantidad mínima de antibiótico que se necesita para inhibir el desarrollo de una determinada concentración de microorganismos.

Conservación: Es el mantener un producto determinado en condiciones estables. O bien, es la acción de preservar un objeto o sustancia de cualquier alteración. Conservación física o química.

Conservador: Son métodos químicos mediante los cuales una sustancia química puede inhibir o destruir microorganismos bajo

condiciones normales de formulación, fabricación, almacenamiento y uso.

Crecimiento: Es el incremento ordenado en todos los componentes de un organismo. En bacterias la multiplicación conduce a un aumento en el número de individuos dando lugar a una población o a un cultivo.

El crecimiento bacteriano puede medirse en términos de la concentración celular (número de células por unidad de volumen de cultivo). Se puede realizar por la absorción de la luz o dispersión de ella por un cultivo, mediante procedimientos fotoeléctricos y relacionar las cuentas viables con las mediciones ópticas en forma de una curva standard.

Cuenta microbiana aeróbica total: Para las muestras que son suficientemente solubles se emplea el Método de placa, o bien el Método de tubo múltiple. En cualquiera de estos se utilizan 10 gramos si la muestra es sólida, o 10 ml. si es líquida, que se disuelven o se suspenden en solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico, de pH 7.2, hasta 100 ml.

Curva de crecimiento presenta cuatro fases:

a) Fase rezagante: Representa el periodo necesario para que unas cuantas células mutantes del inóculo se multipliquen y aumente el número de células.

b) Fase exponencial: Las células aumentan en forma exponencial.

c) Fase estacionaria: El agotamiento de los nutrientes o la acumulación de productos tóxicos o cuando se establece un equilibrio iónico desfavorable (ejemplo pH inadecuado) hace que el crecimiento cese por completo. La duración de esta fase depende del tipo de microorganismo y condiciones del cultivo.

d) Fase de muerte: La tasa de mortalidad aumenta hasta alcanzar un nivel sostenido. Para una célula bacteriana muerte significa la pérdida irreversible de la capacidad de reproducirse (crecimiento y división).

Desinfectante: Agente químico empleado para matar microorganismos sobre superficies, pero demasiado tóxica para aplicarla directamente a los tejidos. La actividad no siempre se extiende a las formas esporuladas.

Esterilización: proceso de destruir a todos los microorganismos y sus formas de resistencia que existen en los productos farmacéuticos, en sus envases, tapones, etc., así como en aparatos instrumentos y material para prueba de laboratorio.

Germicida: Sustancia capaz de matar las formas vegetativas de gérmenes.

Indicadores biológicos: Están constituidos por microorganismos de resistencia conocida al agente de esterilización (temperatura, vapor, óxido de etileno, radiaciones, etc.), superior a la que presentan los contaminantes comunes de tal manera que la suspensión de éstos gérmenes en lugares adecuados y

representativos de la carga del autoclave, permita asegurar que su esterilidad representa un índice seguro de la esterilidad del conjunto.

Índice de sensibilización: es la capacidad relativa de un producto químico para causar irritación alérgica en la piel del ser humano.

Límites microbianos: Son las pruebas por medio de las que se estima el número de microorganismos aerobios presentes en especialidades farmacéuticas de todas clases, incluyendo materias primas, productos en proceso y productos terminados.

Microorganismo aerobio: Respiran tomando oxígeno del aire liberando CO₂.

Microorganismos anaerobios: Viven en ausencia de oxígeno, muriendo al exponerse al aire.

Microorganismos anaerobios facultativos: Se desarrollan en presencia o ausencia de oxígeno, algunos muestran preferencia por una tensión baja de oxígeno.

Microorganismo psicrófilo: Crecen a temperaturas bajas 15-20 °C.

Microorganismos mesófilos: Crecen a temperaturas de 30-37 °C.

Microorganismos termófilos: Crecen a temperaturas de 50-60 °C.

Patrón de referencia: Consisten en una cantidad fija de sustancias o productos similares al que se va a valorar. Deben ser estables,

conservar invariable su actividad y cumplir con el requerimiento de identidad de composición con el producto a valorar.

Pirógeno bacteriano: Son productos del metabolismo de microorganismos, incluyendo endotoxinas (lipopolisacáridos de alto peso molecular que provienen de la membrana de los gérmenes gram negativos). Estos pirógenos bacterianos producen una reacción febril que se acompaña, generalmente, por una respiración deficiente, cianosis, dolor de cabeza, sudor intenso, escalofríos, náuseas, vómitos y otros trastornos gastrointestinales.

Prueba reto o de eficacia (Challenge test): Se somete al conservador a condiciones drásticas para determinar su eficacia. Consiste en preparar una muestra final del producto e inocularla con diferentes clases de microorganismos para ver si el conservador es capaz de evitar la contaminación.

Séptico: Caracterizado por la presencia de microorganismos perjudiciales en el tejido vivo.

Termopares: Son dispositivos apropiados que registran las temperaturas en los diferentes planos horizontales o verticales de la cámara de esterilización del autoclave. Hay termopares que indican, además de la temperatura efectiva de esterilización la duración de la misma.

Testigo: Cualquiera que sea el método de control usado, es esencial que a su vez la técnica tenga su propio control adecuado.

Por ejemplo, la U.S.P. y el N.F. exigen que cada medio de cultivo y en cada ensayo se incuben tubos testigo para asegurar la esterilidad del medio.

Tinción de Gram: Este método sirve para dividir las bacterias en dos clases:

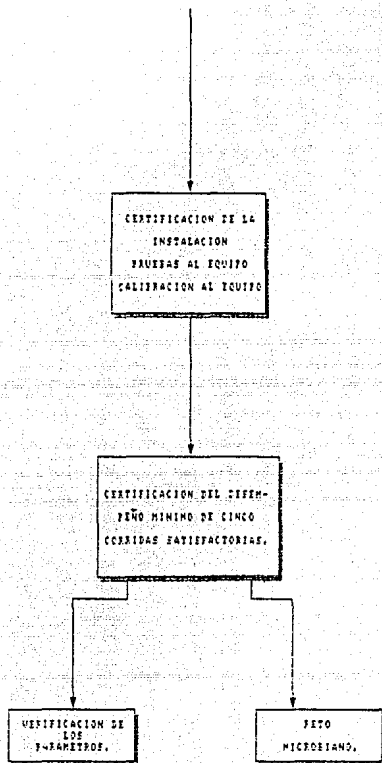
1.- Bacterias Gram positivas: Conservan el color morado del violeta de genciana.

2.- Bacterias Gram negativas: Pierden el violeta de genciana cuando se lava el frotis con alcohol o acetona, por lo tanto, se coloran por contraste.

Validación biológica: Es una prueba que se realiza para investigar la potencia de un producto biológico en relación a un patrón de referencia. Debe ser comparativa, es decir, se evalúa la potencia de determinados productos por las modificaciones que sean capaces de producir en un sistema biológico determinado.

Validación: Es un programa formal para demostrar que un producto específico puede ser esterilizado de una manera confiable por el proceso seleccionado.

PROGRAMA DE VALIDACION



- 1.- Cosmetic Toiletries and Fragance Association, Inc.
"Microbiological Aspects of Quality Assurance"
CTFA Inc. (1971).
- 2.- Sagarin E.
"Cosmetic Science and Tecnology"
Interscience Publishers Inc. New York: 1957.
- 3.- Cowan Raymond A.
"A preservative system must be tailored to a specific product"
Cosmetics and Toiletries, Vol. 92 (15 - 20), March 1977.
- 4.- Yablonskii John.
"Strategies for Cosmetic Preservation"
Cosmetics and Toiletries, Vol. 92 (22 - 31), March 1977.
- 5.- Wallhouser, K.H.
"The problems of preserving Cosmetics"
Cosmetics and Toiletries, Vol. 81 (45), Sept. 1975.
- 6.- Mc. Carthy T.J.
"Further studies on the influence of formulation on
preservative activity"
Cosmetics and Toiletries, Vol. 92 (33 - 36), March 1977.
- 7.- Tenenbaum Saul
"Microbiological content of Cosmetics and sterile Drugs"
Drygs, Cosm. and Perf. 88,(49), Febrero 1973.
- 8.- Liem D.H.
" Analysis of antimicrobial compounds in Cosmetics"

- Cosmetics and Toiletries, Vol. 92 (59 - 72), March 1977.
- 9.- Noble W.
"Dispersal of organisms from human skin"
Cosmetics and Toiletries, Vol. 92 (38 - 45), March 1977.
- 10.- Rosa W.E.
J. Soc. Cosmet. Chem. 28, (83) 1977.
- 11.- Richardson, E. L.
"Preservatives frequency of use in cosmetic formulas as disclosed to FDA."
Cosmetics and Toiletries, Vol. 92, (79 - 86), March 1977.
- 12.- Law, Moss, and Lashen
"Cosmetics and Drug Preservation. Principles and Practice"
John J. Kabara, New York and Basel.
- 13.- Lorenz, Peter.
"5- Bromo-5-Nitro-1,3-Dioxano: A preservative for Cosmetics"
Cosmetics and Toiletries, Vol. 92, (89 - 91), March 1977.
- 14.- Rosen W.E.
"Germall 115 A safe and effective modern cosmetic preservative"
Cosmetics and Toiletries, Vol. 92, (88 - 89), March 1977.
- 15.- Decker, R. L. and Wenninger J. A.
"Preservatives frequency of use in cosmetic formulas as disclosed to FDA."
Cosmetics and Toiletries, Vol. 105, (45 - 47), March 1990.
- 16.- Cosmetic Toiletries Fragrance Association, Inc.
"Microbiological Limit Guidelines for Cosmetics and Toiletries"
CTFA 1973.

- 17.- Davis, Dulbecco, Eisen, Wood.
"Tratado de Microbiología"
2a. Edición, Salvat Editores, S.A.
- 18.- De la Paz, Alvaro.
"Microbiología en Cosméticos"
Parfumería Moderna, 96, (6), Mayo 1977.
- 19.- Jawetz Ernest, Melnick, Adelbery.
"Manual de Microbiología Médica"
5a. Edición, El Manual Moderno, S.A. (1973).
- 20.- Tenenbaum, Saul.
"Pseudomonads in Cosmetics"
Journal Society Cosmetic Chemist 18, (797 - 807), Dic.1967.
- 21.- Jablonski J. I.
"Fundamental Concepts of Preservation"
Cosm. and Perf. 83, 39 (Agosto 1978)
- 22.- Woodward C.R.
"Some Microbiological Aspects of Cosmetic Manufacturing"
Am. Perf. and Cosm. 86, 45 (Agosto 1971).
- 23.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos.
4a. Ed. 1974 S.G.A. Dirección General de Control de alimentos,
bebidas y medicamentos.
- 24.- Helman, José.
"Farmacotecnia Teórica y Práctica"
1a. Ed., Compañía Editorial Continental, S.A., México 1981.

25.- Bjorkner, Bert.

"Contact allergy to the preservative Kathon CG"

Contact Dermatitis 1986: 14: 85-90.

26.- Gruvberger, Brigitta.

"Demonstration of Kathon CG in some commercial products"

Contact Dermatitis 1986: 15: 24-27.

27.- Dahlquist, I.

"Formaldehyde releasers"

Contact Dermatitis 4 (3): 173, 1978.

28.- Fisher, A.A.

"Dermatitis due to formaldehyde - releasing agents in cosmetics and medicaments"

Cutis 22 (6): 555, 658, 662, 664, 708., 1978.