

302927
FEBRUARIO 1995
8.
Zel

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA
DE CONSERVADORES EN PRODUCTOS
COSMETICOS DE TIPO "TOILETTE".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGOO

P R E S E N T A :

MARTHA PATRICIA JUAREZ MORALES

ASESOR DE TESIS: Q.F.B. LUIS RAUL MORALES PONCE

MEXICO, D. F.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

M. EN C. VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ.

DIRECTORA DE LA CARRERA DE Q.FB.

Q.B.P. FRANCISCO JAVIER MAYA UROSA.

ASESOR EXTERNO.

ASESOR DE TESIS:

Q.FB. LUIS RAUL MORALES PONCE.

AGRADECIMIENTOS

A EL SR. CARLOS CASTILLO RIVAS POR SU INVALUABLE AYUDA EN LA ELABORACION DE ESTE TRABAJO.

AL ING. GREGORIO SANCHEZ CASTILLO POR SU AMISTAD Y APOYO DESINTERESADOS.

A LA SRA. ISABEL LOPEZ DE ZUÑIGA POR SU ENTUSIASMO Y TRATO GENTIL.

DEDICATORIAS

A mi madre:

**Lic. en Enfermería y Obstetricia. Martha Beatríz Morales de Juárez
Hermoso Ser Humano que nos invitó a triunfar, y nos enseñó el camino.**

A mi padre:

**Sr. Manuel Juárez Perales, ejemplo de lucha
y fortaleza.**

A mis hermanos:

**Laura, Manuel y Mauricio, con la esperanza de seguir siendo un solo
corazón.**

A Ita y Rosy:

**Porque la vida nos permita seguir en el mis-
mo camino.**

A "La Chulis", Srita. Teresa Manzo Gálvez
Por cada uno de los sueños y esperanzas compartidos.

A mis amigos: I.Q.M. Víctor Manuel Aguilar Ruz.
Quím. Jorge Octavio Sierra Gutiérrez.
I.Q. Daniel Angeles Hernández.
Q.F.B. Alma Nuñez León, por su amistad y apoyo
incondicionales.

A la M. en C. Josefina Viades Trejo
Por la generosidad de su amistad y apoyo para lograr una meta importan-
te en mi vida.

A Luis Raúl, por la confianza que depositó en mi persona.

INDICE

	página.
PRIMER CAPITULO: Introducción _____	1
SEGUNDO CAPITULO: Aspectos teóricos y factores que influyen en la selección de los conservadores _____	9
TERCER CAPITULO: Perfil microbiológico _____	28
CUARTO CAPITULO: Diseño y método experimental _____	44
QUINTO CAPITULO: Resultados _____	56
SEXTO CAPITULO: Análisis de re- sultados y Conclusiones _____	79
SEPTIMO CAPITULO: Glosario _____	112
OCTAVO CAPITULO: Bibliografía _____	116

Primer capítulo. Introducción.

Introducción.

En el desarrollo y producción de cosméticos el problema de la contaminación 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 un sistema conservador específico, el cual se debe escoger no solo teórica sino prácticamente, realizando pruebas en el laboratorio para determinar la concentración óptima.

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 elaboración e higiene llamadas «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 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 éste trabajo se tratará de hacer énfasis en la necesidad de determinar la concentración óptima de metilparabeno y propilparabeno cada producto cosmético de tipo "toilette" (shampoo, acondicionador y crema para manos y cuerpo) con el fin de asegurar que éste sea estable a lo largo de su vida útil, desde su fabricación hasta su consumo. Se hará mención sobre una serie de estrategias que se deben seguir para la preservación de un cosmético de éste tipo, así como de las «BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA», con el fin de evitar una posible contaminación al consumidor.

Historia de la Microbiología Cosmética.

El inicio de la Microbiología Cosmética se dió durante los años 30'S, cuando el Mundo se recobraba del desastre económico del mercado financiero, y el inicio de la Guerra en Europa.

A pesar de esto, sin embargo, la industria cosmética fué capaz de voltear las dos situaciones a su favor. En la historia, los cosméticos se consideraban como lujos y la causa de la «salud» de las clases privilegiadas. Cuando Wall Street cayó, cientos de compañías cosméticas cerraron. Pero muchas otras se establecieron (tales como Merle Norman, Almay, Revlon, Clairol, Shulton y Avon). Estas nuevas compañías se ajustaron rápidamente a éstos tiempos e introdujeron nuevos métodos de mercado, nueva y mejorada propaganda, y lo más importante, nuevos empaques (tamaños más pequeños y a precios más accesibles). Todos esos cambios habían provocado efectos en la industria. Casi totalmente dependiente de las materias primas importadas, las cuales no estarían disponibles por mucho tiempo por la Guerra, la industria volvió a una intensa investigación, la cual le permitió el descubrimiento y desarrollo de sintéticos menos caros y el desarrollo innovador de muchos productos (3).

Por primera vez a lo largo de la historia del uso del cosmético, los productos estaban disponibles a todos los niveles sociales. Esta transición -de lujo a básico- es la principal razón de la espectacular expansión que la industria experimentó años después. En ese tiempo los Estados Unidos entraron a la Segunda Guerra Mundial, la industria se encontraba estabilizada, mucho más independiente y floreciente.

Una muy obvia prueba de que los cosméticos habían «arrivado», fué su adición a la vieja Ley de Alimentos y Medicinas de 1906, convertida en 1938 como el acta de Alimentos, Medicinas y Cosméticos e impuesta por la administración de Alimentos y Medicinas, establecida en 1931 (13).

Los problemas microbiológicos tenían que ver con el notable desarrollo de mohos; la microbiología se volvió más importante para la industria cosmética, se inició la investigación sobre los conservadores. Los parabenos se estudiaron a fondo. Mostrando una actividad antifúngica y siendo una opción de conservador.

Mayores avances en el campo de la Medicina fueron los antimicrobianos por naturaleza.

Primero, el amplio espectro de las sulfonamidas apareció en escena como el primer avance en quimioterapia desde el tratamiento con arsénico de Erlich para la sífilis, introducido 50 años antes. Segundo, la penicilina fué descubierta por Fleming en 1929 y fué popularizada en 1939 cuando Dubois descubrió la tirosina y la guerra había creado una necesidad desesperada por drogas antibacterianas. Los años 30'S representan históricamente el amanecer de los antibióticos.

1940 a 1950.

En los años 40'S la Segunda Guerra Mundial sembró grandes estragos en los campos de batalla. Como en la Primera Guerra Mundial, la industria del cosmético fué declarada no esencial, originando que ciertas materias primas fueran asignadas a otros usos o se volvieron invaluable. Se desarrollaron nuevas materias primas y la industria atravesó otro sano período de cambios. Remarcadamente, los negocios continuaron floreciendo principalmente gracias a que la mujer trabajó en las fábricas; ellas se habían convertido en asalariadas y se sumaron a sus hábitos de consumo, la compra de cosméticos.

Así, esta importante transición económica - de lujo a básico- se estableció como un cambio real, y la industria empezó a experimentar algunos de los problemas de la fabricación a gran escala, desperdicios y toxicidad.

La CTFA (entonces conocida como la Asociación de los Bienes de Tocador) estableció su sección científica en 1943, y M. DeNavarre fundó la Asociación de Químicos Cosmetólogos en 1945. Debido en parte a la publicación de los aspectos científicos de la fabricación de cosméticos y la creciente variedad de pruebas microbiológicas, la microbiología se convirtió en algo más que un conocimiento de paso para la industria cosmética de los 40'S. El desarrollo de mohos seguía siendo un problema importante, los parabenos seguían como opción de preservativos, pero la búsqueda de otros aumentó. Y las bacterias se incluyeron en las pruebas de protección de los preservativos.

1950 a 1960.

A pesar de la Guerra de Corea (1950 - 1953) los últimos años 40'S y los primeros años 50'S fueron tiempos de prosperidad por la llegada de la televisión. La televisión tendría un mayor efecto en las comunicaciones en general y sobre la publicidad en particular. Microbiológicamente, los años 50'S deberían ser llamados la década de el «excesivo uso de antimicrobianos». Los antibióticos habían probado hacer milagros durante la guerra y fueron prescritos después para casi todo.

Las infecciones se habían convertido en cosa del pasado, o eso pensamos con el tiempo. Sin embargo en el inicio de los años 50'S se observó la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos en los hospitales, la industria farmacéutica pronto proporcionó otras alternativas y la euforia de los antibióticos continuó inabitable. Esta euforia se estaba propagando porque lo mismo pasaba con los artículos de tocador. Los químicos obtuvieron compuestos bisfenólicos halogenados (G - 11), piridinetones (ZnPTO), salicilánidas (TBS), carbanilidas (TCC), etc. Esto trajo toda una nueva generación de artículos de tocador, como cremas antibacterianas, pastas dentales, desodorantes y shampoos.

Los preservativos recibieron gran importancia en este período, también en esa década. De hecho, entre la prueba de preservación y la eficacia de nuevos productos antibacterianos, los microbiólogos estuvieron muy activos. Los estudios de preservativos incluían análisis de los mecanismos de acción, incompatibilidades con los ingredientes del producto, los efectos del pH, temperatura, empaque, y muchas pruebas innovadoras como compañías. Los estudios de eficacia incluían MICs y varios bacteriostáticos, bactericidas y primordialmente pruebas para los productos terminados.

Hacia el final de la década la Industria Cosmética y la Medicina comenzaron a poner más atención al creciente problema de la resistencia bacteriológica. En este punto, la mayoría de microorganismos patógenos estaban controlados por antibióticos para gram-positivos como el Diplococcus pneumoniae, Sterptococcus pyogenes y Staphylococcus aureus.

Para el final de los años 50'S, empiezan a aparecer como problema los bacilos gram-negativos, como Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Pseudomonas, etc.(19).

1960 a 1970.

Recordémosla como la era de Vietnam y como un período de inquietud social, los 60'S produjeron un movimiento de regreso a lo natural.

El acento estaba en productos seguros con ingredientes naturales.

Ecologistas, consumidores y mujeres activistas afectaron la industria cosmética. La menos regulada de todas las que producen productos para el consumidor, los cosméticos se convirtieron en el blanco de varios grupos con especial interés y de agencias de gobierno.

Por lo tanto, la industria cosmética tuvo que descartar los últimos vestigios de confiabilidad y abrir sus puertas voluntariamente o enfrentar la posibilidad de una obediencia forzada bajo condiciones injustas. La FDA reconoció que la aplicación de cualquier regulación sería casi imposible sin la cooperación de la industria. Entonces un enlace entre la CTFA/FDA se estableció, y un único programa de autoregulación de la empresa se aceptó.

Que la industria debería tener seguridad microbiológica, se sugirió primero por un reporte de Suecia, concerniente a la contaminación en drogas no estériles y cosméticos. Una segunda sugerencia vino de un reporte de la FDA de la inspección de cosméticos en el área de Nueva York.

La CTFA rápidamente estableció comités de seguridad microbiológica y de calidad, para examinar las causas y desarrollar técnicas de seguridad para la industria (15).

1970 a 1980.

La ráfaga de actividad iniciada por la CTFA a finales de los años 60'S rápidamente se desarrolló dentro de una tormenta de contribuciones. Se emitieron guías técnicas, cubriendo todos los aspectos de la buena fabricación y prácticas microbiológicas. Una supervisión nacional de casi 400 productos probó que el mercado tenía cosméticos y artículos de tocador limpios. A pesar de que había y probablemente siga, pequeñas compañías que hacen productos sin atención al control microbiológico o a las buenas prácticas de manufactura, están rápidamente desapareciendo. Las actividades de la CTFA de los 70'S sirvió para incrementar las precauciones de los factores microbiológicos de fabricación y para educar a la industria sobre la importancia de un mejor control (15).

Durante la segunda mitad de los 70'S, los productos para los ojos estuvieron bajo especial escrutinio, por casos de ceguera que fueron atribuidos a máscara para pestañas contaminadas con Pseudomonas. A pesar de que la mayoría de los productos investigados estaban en buenas condiciones microbiológicas; su habilidad para resistir la agresión de microorganismos durante su uso se cuestionó.

De nuevo la CTFA actuó rápidamente, asignando un grupo especial para el área de los ojos y planeando con el Dr. Ahearn (quien había reportado la máscara contaminada) una comparación entre su método y el de la CTFA de preservación para cosméticos de ojos.

Los microbiólogos clínicos desarrollaron nuevos antibióticos para microorganismos gram-negativos, pero la noticia respecto a la resistencia y adaptabilidad microbiana trajo un sentido común al uso de los antibióticos, moderando la previa tendencia de la sobredependencia y permitiendo incrementar la atención a la asepsia, higiene y sanidad.

Microbiología Cosmética hoy.

La seguridad microbiológica en los productos cosméticos es relativamente nueva, pero es una prioridad vital industrial. Estamos empezando a darnos cuenta que las pruebas de laboratorio no aseguran la calidad del producto. A pesar de que las pruebas son esenciales para establecer la susceptibilidad de los productos al desarrollo microbiano, debemos darnos cuenta también que cada prueba de laboratorio es limitada a una sola formulación, colocada junto con un particular número de materias primas (incluyendo una particular demanda de agua) y más probablemente, es realizado bajo un plan piloto. Estas son limitaciones muy reales.

Mucho más importante para asegurar la estabilidad y seguridad microbiológica es nuestra aceptación que las pruebas de laboratorio no pueden predecir situaciones del mundo real. De hecho, todos los resultados de las pruebas de desarrollo de productos cosméticos deberían ser vistos como información que sirva para clasificar productos de acuerdo al grado de susceptibilidad a la contaminación. Ni más ni menos porque sabemos por experiencia que hay un infinito número de bacterias en el exterior, cualquiera de ellas puede adaptarse y crecer de casi nada. Situar programas de control con sistemas de acción normal, pueden ser mucho más predictivos que cualquier prueba en el mundo.

Los microbiólogos investigadores deben mantener sus responsabilidades más allá de la torre de marfil del producto, desarrollando por escrito normas y diseñando programas de control. Estos investigadores deben responder a los problemas del mundo real.

**Segundo capítulo.
Aspectos teóricos y
factores que influyen
en la selección de los
conservadores.**

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 cosméticos de tipo «toilette», considerándolos desde dos puntos de vista:

1. En primer lugar, en cuanto atañe al consumidor del producto cosmético, cuya salud puede afectarse.
2. En segundo lugar, en lo que se refiere a la estabilidad del producto cosmético, que puede verse comprometida si la calidad y la cantidad de microorganismos se halla por encima de los límites microbiológicos. En este 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 puede ser:

- a) Influencias fisicoquímicas como luz, oxígeno, calor y material de envase.
- b) Enzimas, las cuales pueden introducirse en el producto cosmético con los extractos vegetales o animales.
- c) Y por microorganismos que pueden llegar al cosmético a través de materias primas, proceso de elaboración o al ser utilizados 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 acarrear 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) Formación de gas provocando en ocasiones la explosión del envase.
- f) Modificación de la viscosidad.
- g) Variación del pH.
- h) Separación de fases.
- i) Turbidez.

Es decir, se presentan problemas estéticos del producto, además el consumidor se puede ver afectado por un producto en mal estado.

Características físicas y químicas de los conservadores.

Durante años, los parabenos han probado su utilidad como los preservativos ideales para cosméticos.

Son incoloros, no tóxicos, estables, ampliamente compatibles y efectivos en bajas concentraciones, contra una amplia variedad de microorganismos.

Son los preservativos ideales para cosméticos, farmacéuticos y en la industria alimentaria y de enlatado (J. O'Neill, and C. Mead. The parabens: bacterial adaptation and preservative capacity, presentation made to the Society of Cosmetic Chemists, Washington, D.C.;1981).

PROPIEDADES QUÍMICAS.

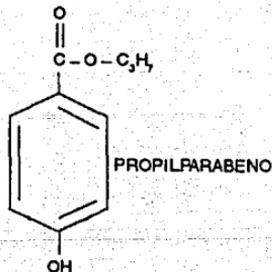
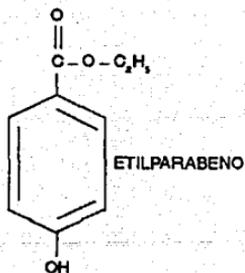
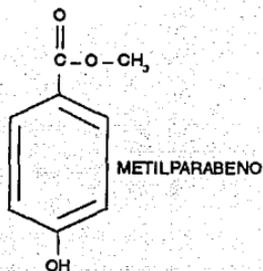
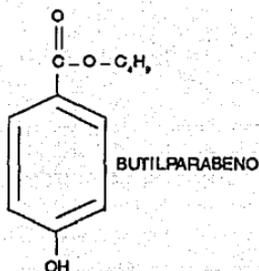
Especificaciones	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
Peso molecular	152.14	166.17	180.21	194.23
Punto de fusión °C	125-128	116-118	95-98	69-72
Acidez	Neutro o ligeramente ácido al tornasol			
Cloruros % Máx.	0.0350	0.350	0.0350	0.0350
Sulfatos % Máx.	0.0200	0.200	0.0200	0.0200
Cenizas % Máx.	0.0500	0.0500	0.0500	0.0500
Pérdida por secado	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000
Pureza % Min.	99.000	99.000	99.000	99.000

Solubilidad (g/100 g solvente)	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
Agua 10°C	0.2000	0.2000	0.2000	0.2000
Agua 80°C	2.0000	0.8600	0.3000	0.1500
Metanol 25°C	59.0000	115.0000	124.0000	220.0000
Etanol 25°C	52.0000	70.0000	95.0000	210.0000
Etanol 10% 25°C	0.5000		0.1000	
Etanol 50% 25°C	18.0000		18.0000	
Glicerina 25°C	1.7000	0.5000	0.4000	0.3000
Propilenglicol	22.0000	25.0000	26.0000	110.0000
Aceite de oliva	2.9000	3.0000	5.2000	9.9000
Aceite de cacahuete	0.5000	1.0000	1.4000	5.0000

Solubilidad
(g/100 g solvente)

Metilparabeno Etilparabeno Propilparabeno Butilparabeno

Acetona	64.0000	84.0000	105.0000	240.0000
Benceno	0.7000	1.6500	50.0000	150.0000
Eter	23.0000	43.0000	0.8000	1.0000
Tetracloruro de carbono	0.1000	0.9000	0.0300	0.1000
Aceite mineral	0.0200	0.0250		
Parafina 80°C	0.1000			1.8000
Parafina 100°C		3.2000	4.2000	



Criterios de selección.

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.

PROCESO DE SELECCION. Propiedades a considerarse para un conservador en una fórmula cosmética.

Cada producto debe tener su conservador o sistema conservador específico. 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 número pequeño de microorganismos no patógenos. Los productos que se aplican directamente a la piel irritada, como lociones para después de afeitarse, aceites y cremas para broncear deben estar libres de microorganismos 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 bactericida. En cambio, otro tipo de productos sólo requieren que el sistema conservador sea bacteriostático, que mantenga al producto libre de microorganismos patógenos y que el número de microorganismos patógenos decline con el tiempo. Por todo esto, es muy importante decidir qué tipo de conservador y a qué 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 óptima» en el producto terminado ya que, cuanto más alta la concentración de éste, más alta la efectividad. Si la concentración de un conservador no puede aumentarse por razones de solubilidad, el uso de sistemas binarios o ternarios es lo recomendable.

3. El conservador debe ser compatible con todos y cada uno de los ingredientes de la fórmula y con el empaque. El efecto de otros componentes es el factor más complejo 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.

Ejemplo, las proteínas inactivan a los fenoles, parabenos, catiónicos y mercuriales por enleques químicos o alteración física, o los tensoactivos 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 antagonico).

Así mismo, la lanolina, la metilcelulosa, lecitina, caolín, óxido de zinc y algunos polímeros grandes con propiedades mucilaginosas como son: goma de tragacanto, PVP, metilcelulosa y carboximetilcelulosa, 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 aditividades de cada uno de ellos por separado.

Deben tener diferentes modos y sitios de acción.

4. La introducción de envases de plástico ha incrementado los problemas de incompatibilidad. Ciertos tipos de PVC (cloruro de polivinilo) pueden inactivar los bactericidas 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 bactericidas y puede reducir la actividad de los conservadores fenólicos y los cuaternarios de amonio.

Por todo esto, es de suma importancia aprender que un sistema conservador debe probarse en producto cosmético terminado.

También es posible mejorar un sistema conservador mediante ciertos componentes del cosmético, por ejemplo el alcohol y propilenglicol, ya que a menudo la presencia del alcohol en concentraciones del 4% al 6% ha incrementado la efectividad de algunos conservadores. El propilenglicol aumenta la actividad de los parabenos. En general, los materiales (como: glicerina, sorbitol, hexilenglicol y butilenglicol) que incrementan el coeficiente de partición de los conservadores causan una pérdida de actividad y los que disminuyen los coeficientes de partición provocan un aumento en la efectividad de estos.

5. El conservador es más efectivo cuando se disuelve en la fase acuosa ya que así no migra hacia la fase oleosa. En una emulsión el conservador se divide entre las fases, dependiendo de su solubilidad relativa entre ellas. Un conservador como el metilparabeno puede formularse disolviéndolo en la fase acuosa pero al estar en reposo por lo general, migrará hacia la fase oleosa la cual desafortunadamente se puede 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 agua/aceite o aceite/agua el conservador se distribuye así mismo, de acuerdo a su coeficiente de partición. Esta distribución puede ser modificada por la presencia del emulsificante. 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 varíe con el tiempo.

En general, son pocos los conservadores que son efectivos en un rango alcalino con respecto a 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 intrínseca del conservador. Albert (18) 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 forma disociada, cuanto más alto es el valor de pKa mayor es la eficacia del ácido como conservador.

Aalto y Bandelin (18) señalaron que la actividad de los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico casi no es afectada por el pH. El valor de pKa del metilparabeno es de 8.5 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 un pH menor de 2 ó 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 lo son en una escala ácida.

A ciertos pHs, muchos conservadores se vuelven menos eficaces o menos estables. Los compuestos 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.

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 8.5 sólo la mitad sigue en forma activa.

8. El tiempo es otro factor. Mientras más largo es el tiempo de contacto, más microorganismos morirán. Para propósitos de conservación normalmente no es necesario tener una acción bactericida 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 duran en almacén por tres años o más; los conservadores deberán controlarse cuidadosamente con 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 microorganismos resistentes.

9. Una propiedad básica que se debe probar en todo conservador es su capacidad para producir reacciones alérgicas que presentan un peligro para el usuario normal.

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 observar qué 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 fabricación. 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 su adsorción; ejemplo, cloruro de cetil piridinio y cloruro de benzalconio por talco y caolín.

Pruebas químicas bacteriológicas indican que una proporción queda adsorbida irreversiblemente. Barr y colaboradores (30) describen la inactivación de conservadores catiónicos por barro aniónico.

El talco reduce la actividad del metilparabeno y alcohol benzílico en un 90%.

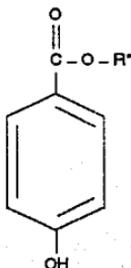
Hugo y Wilson (30) reportan que *Pseudomonas aeruginosa* se multiplica fácilmente en agua que ha sido agitada con talco, lo cual es de suma importancia en la preparación de aguas aromáticas.

No solamente los conservadores se adsorben sobre las partículas sólidas sino también sobre los microorganismos como *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.

ESTERES DEL ACIDO p-HIDROXIBENZOICO. (PARABENOS)



R* = Puede ser un grupo alquilo o bencilo.

Estos ésteres, llamados por lo común parabenos, son ampliamente utilizados en preparaciones farmacéuticas, cosméticos y artículos de tocador, fueron desarrollados en Europa por Sabalitscka.

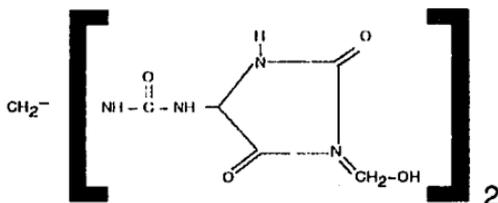
Son bacteriostáticos y fungistáticos, efectivos en pHs ácidos (23).

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. Se demostró que la actividad antimicrobiana aumenta con el tamaño de la molécula. Ya que los ésteres son compuestos lipofílicos, su sitio de acción es la membrana celular, sin descartar un efecto producido sobre sistemas enzimáticos por acción competitiva.

Investigación teórica de algunos conservadores.

Germall 115.

Es un derivado de un compuesto heterocíclico. Su nombre adoptado por la CTFA es Imidazolidinil urea. La fórmula molecular es: $C_{11}H_{16}N_2O_8 \cdot H_2O$. 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 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, está 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 (23) 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 fórmulas cosméticas, ya que puede añadirse como polvo o como solución concentrada. Dado que el Germall 115 es insoluble en fases oleosas, por lo general menos de un centésimo de uno por ciento no emigra hacia la fase oleosa, sino que se queda en la fase acuosa.

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 a los microorganismos gram-negativos.

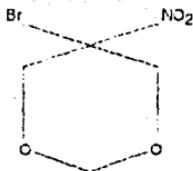
No sólo se ha reportado (23) que se ha tenido resultados positivos con el uso de Germall 115 y los parabenos sino que también se usado otras combinaciones con ácido sórbico, compuestos cuaternarios de amonio y otros conservadores.

BRONIDOX L.

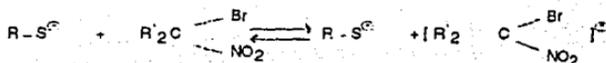
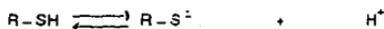
Este agente antimicrobiano fue desarrollado por Henkel & Cia. Su nombre químico es 5-bromo-5-nitro-1,3 dioxano en solución en 1,2-propilenglicol.

$C_4H_6BrNO_4$.

P.M. 212 0



Es un material estable a la luz y calor arriba de 50 °C, así como a pHs entre 5.0 y 9.0. El modo de actuar de este producto no se basa en el desdoblamiento de formaldehído, sino que puede calificarse como "reacción de oxidación" de los grupos tiol de ácidos mercaptoamínicos. Stretton y Manson (16) 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-positivas, gram-negativas, hongos y levaduras, pero especialmente contra *Pseudomonas 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, tensoactivos 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 para baño de espuma.

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 contra bacterias gram-positivas, gram-negativas, hongos y levaduras y no libera formaldehído. Este agente conservador fue desarrollado muy recientemente por Calgon Corp. subsidiaria de Merck Co. . Es compatible con la mayoría de los componentes cosméticos a excepción de los tensoactivos 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 tapas 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, 100 g de agua disuelven 0.4 g de Euxil K 400: Es soluble en solventes polares como 1,2-propilenglicol, propanol, acetona. Poco soluble en glicerina y sorbitol.

Ventajas de los preservativos más utilizados.

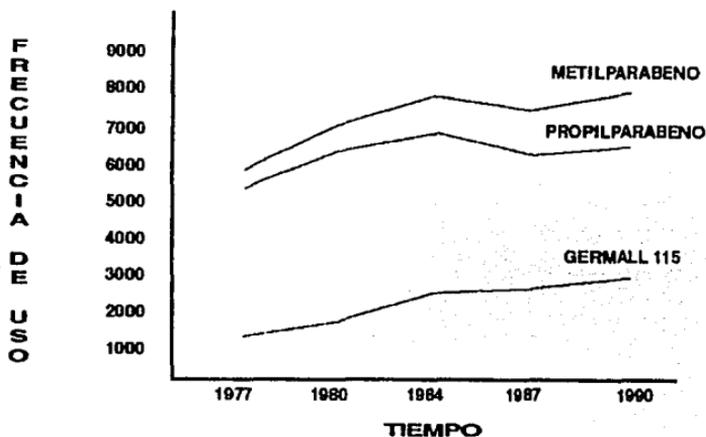
Preservativo.	Ventajas.	Niveles de efectividad.	Utilizado en:
Alcoholes, por ejem., alcohol etílico y alcohol isopropílico.	Amplio espectro.	1.0 - 15 %	Todos los productos.
Cuaternarios de amonio.	Ingrediente activo en desodorantes.	0.1 - 0.5%	Productos catiónicos.
Acido benzoico, sórbico y dehidroacético.	Antifúngico.	0.1 - 0.8%	Productos acuosos con bajo pH.
Formaldehído.	Amplio espectro, soluble en agua. Mantiene su actividad en presencia de tensoactivos.	0.1 - 0.2%	Todos los productos.
Parabenos (p- hidroxibenzoatos).	Amplio espectro, se utilizan en rangos de pH grandes.	0.1 - 0.4%	Todos los productos.
Mercuriales.	Amplio espectro.	66 ppm	Productos para área ocular.
Fenoles.	Amplio espectro.	0.1 - 0.5%	Todos los productos.

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

En 1977 la FDA (Food and Drug Administration) 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 Estados Unidos son: Metilparabeno, Propilparabeno y Germall 115 como se muestra en la siguiente tabla:

Conservador.	Frecuencia de uso				
	1977	1980	1984	1987	1990
Metilparabeno	5693	6975	7694	7306	7754
Propilparabeno	5329	6174	6796	6030	6343
Germall 115	1254	1684	2315	2499	2749

Gráfica de aumento en la frecuencia de uso de los principales conservadores.



Tercer capítulo.

Perfil microbiológico.

Perfil microbiológico.

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, Pseudomonas aeruginosa es de las más frecuentes y peligrosas.

Algunos de los géneros reportados son los siguientes:

HONGOS

Absidia
Alternaria
Aspergillus
Citromyces
Cladosporium
Dematium
Fusarium
Helminthosporium
Geotrichum
Mucor
Paarilomyces
Penicillium
Rhoma
Pullularia
Rhizopus
Verticillium

BACTERIAS

Achromobacter
Aerobacter
Bacillus
Enterococcus
Escherichia
Klebsiella
Micrococcus
Proteus
Pseudomonas
Sarcina
Serratia
Staphylococcus
Streptococcus

LEVADURAS

Candida
Saccharomyces
Zigozaccharomyces

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

Principales agentes contaminantes.

A) BACTERIAS.

a) Pseudomonas 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 distribuidos en el suelo, agua clorada, desionizada, desmineralizada, aguas negras y en el aire. No fermentan la lactosa y forman colonias redondas, lisas de color verdoso fluorescente y de olor aromático dulzón; de las colonias se difunde un pigmento verde-azul 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 o cuando participa de infecciones mixtas; se la ha asociado a procesos supurativos, infecciones de córnea, úlcera, otitis, mastoiditis, y pueden 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, elimina casi toda la flora normal que puede competir con Pseudomonas, 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 máscara para pestañas, lociones para manos y cuerpo, lociones para la cara, lociones fijadoras para el cabello, shampoos, etc.

Pseudomonas no sólo 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. 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 Pseudomonas. La experiencia ha demostrado que un producto con preservación deficiente no sólo se ve contaminado por un microorganismo específico, esto es, una crema susceptible a Pseudomonas no lo es a Staphylococcus o levaduras, aún cuando la 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 éstas bacterias, que aquellas que contienen emulsificadores aniónicos o catiónicos.

Propiedades de Pseudomonas: Solamente en algunos casos puede reconocerse mediante algunas de sus propiedades más notables como la formación de pigmento, o por exámen microscópico, ya que se pueden considerar como bastones cortos gram-negativos móviles, con prueba de oxidasa positiva.

Las Pseudomonas psicrófilas pueden hallarse en el suelo, agua dulce, la piel, los alimentos y en la materia fecal.

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, atacan la caseína, producen amilolisis y son más activas a los 25 °C y en un pH de 7.0 a 8.0. Son microaerófilas, 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 aguda o crónica. Da lugar a inflamación, necrosis y formación de abscesos.

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 encapsulados. 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 horas, se observan colonias grandes, de 2 mm de diámetro, redondas convexas, brillantes, de borde continuo, con consistencia grasa 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 emolíticas 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 tinción 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 la coagulasa para incluir o no a la cepa aislada en la especie estafilococo dorado.

Los estafilococos forman parte de la flora normal en la piel humana y de los aparatos respiratorio y digestivo; se encuentran también en el aire y en los lugares habitados por el hombre. El prototipo de la lesión estafilocócica es el furúnculo u otro absceso localizado. El establecimiento de grupos de estafilococos en un furúnculo piloso da lugar a necrosis del tejido.

c) Enterobacterias.

Los organismos entéricos son un gran grupo de bacilos gram-negativos que abarcan los géneros Escherichia, Enterobacter y Klebsiella, son no esporulados, cuyo hábitat 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 una 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 otras enterobacterias.

Escherichia coli.

E. coli es la especie predominante en el intestino grueso; por ello se denomina también «colibacilo», pero también puede provocar enfermedades en cualquier otra parte del organismo.

Algunas variedades son responsables de la gastroenteritis. 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.

d) 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, estereato de zinc, carbonato de magnesio; algunos como Candida albicans proceden del personal.

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

Candida albicans es dimórfico. En la superficie de los medios sólidos ricos crece como levaduras gemantes ovoides, 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.

Factores que afectan el desarrollo microbiano.

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

1. De hecho, la composición del producto cosmético proporciona muchos de los nutrientes que necesitan los microorganismos.

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 microorganismos prefieren un contenido alto de agua, por lo general superior al 15%.

Los polvos secos se hacen más 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 o 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 contaminantes 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 de los hongos y levaduras que 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.

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

Actividad antimicrobiana de los conservadores.

Estos conservadores tienen la propiedad de inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras. No todos ellos tienen el mismo grado de actividad contra los mismos microorganismos. Por ejemplo, una concentración de 0.4% es necesaria, si usamos metilparabeno para inhibir o retardar el crecimiento de Staphylococcus aureus, pero la concentración necesaria de butilparabeno es solo de 0.012%. Por otro lado, la cantidad debe ser doblada, en caso de usar butilparabeno en lugar de metilparabeno, para retardar el crecimiento de Pseudomonas aeruginosa. La siguiente tabla muestra la concentración necesaria de estos conservadores, para inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos.

Concentración necesaria de parabenos para inhibir la actividad microbiana.
(mcg/ml)

	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
<u>Aspergillus niger</u>	1000	400	200	100
<u>Aspergillus oryzae</u>	1000	400	200	100
<u>Penicillium digitatum</u>	300	250	63	63
<u>Rhizopus nigricans</u>	500	250	185	183
<u>Trichoderma lignorum</u>	250	130	125	63
<u>Chaetomium globosum</u>	1500	750	200	100
<u>Trichophyton mentagrophytes</u>	160	80	40	20
<u>Trichophyton rubrum</u>	160	80	40	20
<u>Candida albicans</u>	1000	1000	120	120
<u>Saccharomyces cereviceae</u>	1300	750	240	100
<u>Saccharomyces pastorianus</u>	1300	750	240	100
<u>Bacillus subtilis</u>	2000	1000	250	125
<u>Bacillus cereus var. mycorides</u>	2000	1000	1250	63
<u>Staphylococcus aureus</u>	4000	1000	500	120
<u>Sarcina lutea</u>	4000	1000	500	120

Concentración necesaria de parabenos para inhibir la actividad microbiana.
(mcg/ml)

	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	1000	500	250	125
<u>Escherichia coli</u>	2000	500	1000	4000
<u>Salmonella typhosa</u>	2000	1000	1000	1000
<u>Salmonella shottmuelleri</u>	2000	1000	500	1000
<u>Proteus vulgaris</u>	2000	1000	500	500
<u>Aerobacter aerogenes</u>	2000	1000	1000	4000
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	4000	4000	8000	8000

El propilenglicol puede aumentar la actividad de los parabenos, que han sido bien disueltos en él. El uso del propilenglicol como un ingrediente puede ser por lo tanto recomendado.

Los emulsificantes no iónicos reducen la actividad de los conservadores, un porcentaje de los parabenos es ligada por los emulsificantes. Adelgazadores, gelatina y carboximetilcelulosa tienen la misma propiedad, pero en menor grado.

Fuentes de contaminación primarios y de producto terminado.

Para poder analizar los posibles orígenes de contaminación microbiana, se debe saber que en todas las etapas por las que pasa un cosmético durante su vida está sujeto a contaminación; a esto hay que agregar que la composición de muchos de ellos es un medio rico en nutrientes que pueden aprovechar los microorganismos para su desarrollo.

A continuación se mencionan los posibles orígenes de contaminación, los cuales deben ser analizados detalladamente. Estos pueden ser clasificados en:

Factores primarios.

Es la contaminación obtenida durante el proceso de fabricación del producto cosmético.

Estos comprenden a:

- 1) Materias primas.
- 2) Equipo de manufactura.
- 3) Medio ambiente.
- 4) Personal.
- 5) Equipo de llenado.
- 6) Materiales de empaque.

Materias primas.

De los diversos ingredientes que se usan para fabricar cosméticos, algunos de ellos muestran frecuentemente niveles de contaminación que no se encuentran dentro del límite microbiológico permitido, por lo que es necesario analizar tanto a las materias primas de origen animal como a las de origen vegetal y a las de origen sintético, incluyendo agua.

Equipo de manufactura.

Un segundo origen de contaminación es el equipo, sobre todo en aquellos productos que durante su proceso de fabricación no incluyen ningún calentamiento. Los microorganismos están constantemente reproduciéndose y el crecimiento microbiano puede no ser observado durante un período relativamente prolongado al no ser visibles en los rincones y hendiduras del equipo de la planta. Si esto ocurre, los microorganismos avanzarían hasta que finalmente, aparecerían en el producto terminado. El control de contaminación microbiológica debe llevarse a cabo como parte vital en la fabricación del producto. Es indispensable la limpieza del equipo después de que se haya usado. Como una práctica regular, se deben limpiar las líneas, calderas, tanques y todos aquellos utensilios usados en la manufactura de cosméticos susceptibles de contaminación con agua caliente, vapor y/o soluciones sanitizantes para ayudar a realizar una fabricación libre de contaminación.

Medio ambiente.

El tercer origen de contaminación es el medio ambiente. Las condiciones higiénicas del local de manufactura necesariamente repercute en los productos que se elaboran en él. El área debe contar con pisos, paredes y techos limpios sin superficies rugosas o permeables.

Las puertas protegerán las áreas de manufactura del medio ambiente exterior para minimizar la circulación de aire. Los sistemas de ventilación deben incluir filtros intercambiables, adecuados para mantener una entrada limitada de partículas materiales, insectos, bacterias y otros contaminantes. Se tendrá presión positiva en áreas que contengan material fácil de contaminarse, las ventanas tendrán tela de alambre y habrá un buen control de roedores e insectos.

Personal.

Para que un producto sea de buena calidad, se requiere que toda la gente que se encuentra en contacto directo de la fabricación del mismo, especialmente aquellos que pesan las materias primas, quienes operan la maquinaria, etc., desempeñe sus obligaciones en una forma adecuada, para así obtener una venta exitosa y un producto de buena calidad.

El área de producción estará provisto de un lavamanos. Hay que recordar con anuncios al personal que debe lavarse las manos, explicando claramente la facilidad del aseo. No se permitirá comer o fumar en las áreas de manufactura. Debe enseñársele al trabajador la importancia de una buena higiene personal. Deben estar adecuadamente vestidos, cabellos cubiertos y frecuentes lavados de manos, particularmente después de los períodos de descanso, comidas, o ir al baño. Es recomendable el uso de guantes protectores, cofias para retener el cabello, uniformes limpios, así como exámenes periódicos que aseguren la condición sanitaria del personal.

Equipo de llenado.

Gran parte de lo que se dijo en cuanto al equipo de manufactura es aplicable al equipo de llenado. Pero debido a que esto es más complejo, es recomendable que el equipo se desensamble totalmente, se limpie y sanitice cada vez que sea posible, dependiendo del equipo o del producto de que se trate. Es importante que no queden residuos del sanitizante en el equipo y que se le conserve debidamente cubierto. Una vez sanitizado el equipo, deberán correrse pruebas para confirmar si el equipo fué debidamente sanitizado.

Materiales de empaque.

El empaque primario suele ser también una fuente de contaminación, aunque originalmente se fabrican prácticamente en condiciones microbiológicamente aceptables.

Su contaminación proviene principalmente del polvo, por lo que se recomienda sean conservados en lugares limpios y secos y de preferencia en envases cerrados y cubiertos con plástico, que no permitan la entrada del polvo.

Se deben realizar pruebas periódicas en los materiales de empaque apropiados, o envases del producto, asegurando así las especificaciones microbiológicas de la compañía.

Factores secundarios.

Con este nombre se conoce a la contaminación que se produce durante el uso del cosmético hasta su terminación. Es la más difícil de predecir, ya que su naturaleza puede ser muy diversa y es prácticamente imposible de evitar. Según Wallhousser (29) cada vez que se introduce un dedo en una crema para tomar una pequeña porción, se deja de 20 - 100 microorganismos que pueden reproducirse en el producto. Esto da una idea de lo que debe soportar el producto cosmético durante semanas y en ocasiones años en que se mantiene en uso. La única solución posible a este tipo de contaminación es la presencia de un buen sistema conservador, aunque también puede ayudar el uso de aplicadores, atomizadores, tubos colapsibles, sistemas en aerosol y cualquier tipo de envase que evite el contacto directo del producto con el consumidor

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).

Posible mecanismo de acción de algunos conservadores.

- | | |
|----------------------------|---|
| 1. Acido benzolco. | Acción a nivel de membrana; desnatura enzimas y otras proteínas. |
| 2. Acido bórico. | Inhibición de la fosforasa en anaerobios. |
| 3. Parahidroxibenzoatos. | Acción a nivel de membrana; desnaturizan enzimas y otras proteínas. |
| 4. Fenoles. | Acción a nivel de membrana; desnaturizan enzimas y otras proteínas. |
| 5. Cuaternarios de amonio. | Acción lítica en la membrana y destrucción de DNA. |
| 6. Alcoholes. | Desnaturizan y desorganizan la estructura lipídica de la membrana celular |
| 7. Acido dehidroacético. | Inhibición del sistema ciclo fosforasa en anaerobios. |
| 8. Acido salicílico. | Acción a nivel de la membrana, competencia con coenzimas y con el metabolismo de aminoácidos. |
| 9. Acido monocloroacético | Destruyen estructuras esenciales de la membrana citoplásmica y del DNA. |
| 10. Acido sórbico. | 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. | Destruyen estructuras esenciales de la membrana citoplásmica y del DNA. |

Rangos microbiológicos permitidos.

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:

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

Mientras un estándar 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 límites 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 estándar.

Criterios específicos.

Productos para bebé:

No más de 500 colonias por g. ó ml. de producto terminado.

Productos usados alrededor de los ojos:

No más de 500 colonias por g. ó ml. de producto terminado.

Productos orales:

No más de 1000 colonias por g. ó ml. de producto terminado.

Todos los demás productos:

No más de 1000 colonias por g. ó ml. de producto terminado.

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

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

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

Cuarto capítulo. Diseño y método experimental.

Diseño experimental.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la concentración óptima de conservadores para la prevención de posibles contaminaciones de tipo microbiológico, en productos cosméticos de tipo "toilette" (shampoo, acondicionador y crema para manos y cuerpo).

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Realizar una revisión bibliográfica de los posibles contaminantes microbiológicos de estos productos.
- Realizar una revisión bibliográfica de los principales conservadores utilizados en estos productos.
- Elegir una metodología adecuada para encontrar la concentración óptima de conservador.
- Encontrar la concentración y proporción óptima de conservadores (metilparabeno y propilparabeno).

Planteamiento del problema.

Debido a la contaminación presentada en algunos productos cosméticos de tipo "toilette" (shampoo, acondicionador y crema para manos y cuerpo) que una empresa de cosméticos produce, se ha planteado la posibilidad de que ésta ocurra debido a que las concentraciones utilizadas de los conservadores no es la óptima, por lo tanto, es necesario comprobar a través de un método microbiológico, el efecto de la concentración de metilparabeno y propilparabeno frente a determinados microorganismos.

El método propuesto para realizar el trabajo es el de la casa matriz de una compañía de productos cosméticos.

El análisis se efectuará a: una semana, un mes y a dos meses.

El reto microbiológico se realizará frente a los siguientes microorganismos:

Candida albicans.

Escherichia coli.

Staphylococcus aureus.

Las condiciones de almacenamiento de los microorganismos será a 4 °C.

Las condiciones de incubación serán a 35 - 37 °C.

Las condiciones de almacenamiento de los lotes será a temperatura ambiente.

Diseño experimental.

Determinación de variables.

1. Rango de concentración del conservador.

El rango de concentración se estableció a partir de los datos proporcionados por la compañía cosmética en donde se realizó el trabajo de investigación, siendo de 0.10%, 0.25% y 0.40% respectivamente. Las proporciones de metilparabeno y propilparabeno se encontraron dentro del rango de 0.0%, 50.0% y 100.0%. Estos datos abarcan a los tres productos cosméticos que se elaboraron (shampoo, acondicionador y crema para manos y cuerpo) y a los que se les hizo la prueba de reto microbiológico para determinar la concentración óptima de cada uno de ellos. Se planteó un diseño estadístico central compuesto con dos variables y dos niveles con un total de 9 experiencias. los resultados se analizaron mediante el programa de computadora Design-Expert Versión 2.07 Stat-Easy.

2. Tiempo.

El tiempo de prueba para cada uno de los productos a estudiar (shampoo, acondicionador y crema para manos y cuerpo) fué el determinado por la casa matriz de la compañía cosmética, al igual que el establecido como prueba rápida por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y por el Diario Oficial de la Federación publicado el jueves 4 de agosto de 1994. Esta prueba se realiza a: una semana, un mes y dos meses respectivamente para cada una de las concentraciones y para cada uno de los productos en estudio.

3. Microorganismos.

Los microorganismos de prueba se seleccionaron a partir de los estudios de control microbiológico realizados en los productos contaminados durante su elaboración en la compañía cosmética hallándose como principales contaminantes a *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*.

De acuerdo a la información de la compañía cosmética y al Diario Oficial de la Federación las cepas de referencia con las que se llevaron a cabo las pruebas fueron las siguientes:

Candida albicans (ATCC 10231)

Escherichia coli (ATCC 10536)

Staphylococcus aureus (ATCC 6538)

4. Dilución de microorganismos.

La dilución de los microorganismos de prueba se realizó de acuerdo a el Método de estandarización de concentración de suspensiones de bacterias, conocido como Nefelómetro de Mac. Farland, el cual señala que la turbidez de una suspensión prueba es comparada con la turbidez respectiva de una serie de 10 tubos conteniendo soluciones de sulfato de bario; preparadas mezclando cantidades de sol. de cloruro de bario al 1.0% y ácido sulfúrico al 1.0% de acuerdo a la siguiente tabla:

Escala de Mac. Farland.	BaCl ₂ 1.0% (ml)	H ₂ SO ₄ 1.0% (ml)	No. bacterias · 10 ⁶
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	1.0	9.0	3000

La dilución de microorganismos con la que se trabajó fué la de $300 \cdot 10^6$ microorganismos debido a que según la técnica que sigue la compañía cosmética indica que se deben inocular $5 \cdot 10^6$ microorganismos por gramo o ml. de producto, y se trabajaron 60 g. de muestra por cada concentración de conservador a estudiar y por cada uno de los microorganismos de prueba.

Los microorganismos de prueba se inocularon a cada producto con su respectiva concentración de conservadores de acuerdo a la comparación realizada de la turbidez del Nefelómetro de Mac. Farland contra una suspensión de microorganismos preparada en el laboratorio de control de calidad de la compañía cosmética, tomándose la suspensión que contuviera el número de microorganismos requeridos para la prueba. El inóculo se manejó en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar, utilizándose el mismo día en que se preparó.

5. Temperatura.

La temperatura con la que se almacenaron las muestras fué a la temperatura ambiente, de acuerdo al Centro de Investigación de la compañía cosmética.

La temperatura de incubación de las muestras fué de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$; la temperatura de almacenamiento de las cepas fué de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Medios de cultivo utilizados.

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron los siguientes:

Agar Vogel - Johnson.

- Forma de activación.

El crecimiento de los microorganismos de acompañamiento es inhibido casi totalmente por el telurito, el cloruro de litio y una elevada concentración de glicina. Una eventual inhibición, pequeña de los estafilococos, es compensada por la manita y la glicina. La manita sirve simultáneamente como sustancia reaccionante para la diferenciación, pues es degradada a ácido por la mayoría de los estafilococos patógenos. La formación de ácido se comprueba por el viraje a amarillo que sufre el rojo de fenol. Los estafilococos patógenos reducen además el telurito metálico, y en consecuencia, producen colonias de color negro (22).

- Empleo e interpretación.

Incubación: 48 horas; 35 - 37 °C.

Los estafilococos patógenos crecen casi siempre ya en 24 horas.

Colonias.	Microorganismos
Pequeñas, negras, con halo amarillo.	Estafilococos patógenos
Pequeñas, negro-grisáceas, sin halo.	<u>Staphylococcus epidermidis.</u> <u>Prot. hauseria</u> casi totalmente inhibido y otros

Agar E.M.B. (Agar selectivo para la demostración y aislamiento de enterobacterias patógenas, según Holt-Harris y Teague).

- Forma de activación.

El contenido en lactosa y sacarosa hacen posible la distinción de salmonellas y de shigellas lactosa-negativas y sacarosa-negativas, frente a la flora acompañante lactosa-negativa pero sacarosa-positiva. Los microorganismos de acompañamiento, indeseables, como bacterias gram-positivas especialmente, resultan notablemente inhibidos en su crecimiento gracias a los colorantes presentes en la formulación (11).

- Empleo e interpretación.

Incubación: 1-2 días, a 35 - 37 °C.

Colonias: Redondas, verdosas con brillo metálico a la luz reflejada, con el campo negroazulado a la luz transmitida.

Colonias	Microorganismos
Transparentes, de color ambarino	<u>Salmonella</u> , <u>Shigella</u>
Verdosas con brillo metálico a la luz reflejada, con el centro negro-azulado a la luz transmitida	<u>Escherichia coli</u>
Más grandes que las de <u>E. coli</u> , mucosas, confluentes, con el centro pardo-grisáceo a la luz transmitida	<u>Enterobacter</u> , <u>Klebsiella</u> y otros

Agar Mycosel.

- Forma de activación.

El agar mycosel es un medio selectivo que contiene cicloheximida, dextrosa y cloranfenicol. Se recomienda para la identificación y aislamiento de Candida albicans y hongos patógenos. La dextrosa es una fuente de energía para el metabolismo de estos microorganismos, la cicloheximida inhibe el desarrollo de microorganismos saprófitos, el cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro que inhibe el desarrollo de microorganismos gram-positivos y microorganismos gram-negativos.

- Empleo e interpretación.

Incubación: 1-2 días. a 35 - 37 °C.

Colonias: Redondas, blancas, con brillo a la luz reflejada. Apariencia cremosa.

Método experimental.

1. Técnica en placa.

El propósito de utilizar medios de cultivo sólidos en cajas de Petri, consiste en que al inocular cantidades sucesivamente menores de material en el medio; en un tiempo establecido, los microorganismos son colocados en una capa tan delgada que les permita el crecimiento de colonias individualmente aisladas.

Al obtener éstas colonias, es posible identificar al microorganismo por medio de una tinción de Gram o una resiembra en un medio de cultivo específico.

2. Preparación de lotes de productos (shampoo, acondicionador y crema para manos y cuerpo) y Medios de Cultivo.

Los materiales necesarios para la preparación de muestras y medios de cultivo se enumeran en la siguiente lista:

- a) Pipetas graduadas estériles de: 1, 5 y 10 ml.
- b) Botellas de dilución; conteniendo 95 ml de diluyente estéril.
- c) Cajas de Petri estériles.
- d) Termómetro.
- e) Autoclave "EELISA"; Mod. FF292
- f) Viscosímetro "Brookfield"; Mod. RTVD
- g) Refrigerador "CE.RE.MA.CO."; Mod. TBX18Z
- h) Agitador con propela "Caframo"; Mod. J.8
- i) Potenciómetro "Conductronic"; Mod. pH 20
- j) Balanza analítica "Sartorius"; Mod. A200S
- k) Parrilla eléctrica "Cormex"; Mod. PCM-35
- l) Emulsificador para laboratorio "Silverson"; Mod. L2R
- m) Reactivos, medios de cultivo y equipo propio del laboratorio de microbiología y de control de calidad.
- n) Estándares y materia prima de los productos a elaborar (shampoo, acondicionador y crema para manos y cuerpo).

Los medios de cultivo se prepararon de acuerdo a las especificaciones que marca el laboratorio proveedor; es importante hacer mención que toda la técnica de preparación se desarrolló en una campana de flujo laminar en condiciones estériles.

Los lotes de productos se fabricaron de acuerdo a las normas y especificaciones de la compañía cosmética.

4. Desarrollo de la Técnica.

Procedimiento para la siembra en placa en condiciones aeróbicas y conteo de colonias, para todas las muestras.

a) Usar material y técnicas asépticas.

b) Limpiar la tapa o aplicador del envase que contiene al cosmético con etanol al 70%.

Transferir por medio de una pipeta, jeringa o espátula 10 ml ó 10 g del producto a una botella de dilución que contenga 95 ml de diluyente.

c) Homogenizar perfectamente, agitando la botella de dilución.

d) Colocar 1.0 ml de la dilución en una caja de Petri. Debe hacerse por duplicado.

e) Añadir el agar fundido (aproximadamente 15 ml) a 45 - 48 °C y girar la caja lo suficiente para dispersar el producto. Cuando haya solidificado, invertir la caja de Petri e incubar a 30 - 35 °C durante 48 horas. Después de transcurrido este lapso, contar el número de colonias presentes con ayuda de un cuentacolonias.

f) Seleccionar la caja de Petri que contenga un número de 30 -300 colonias. El contenido de microorganismos se obtiene multiplicando el número de colonias por el factor de dilución.

Este procedimiento se realizó a : una semana, un mes y dos meses respectivamente, que es el tiempo que dura la "prueba rápida".

DIAGRAMA DE FLUJO DE PROCESO.



- Este diagrama de flujo corresponde a cada uno de los productos.
- El número total de días a trabajar para cada uno de ellos fué de 62 días.
- En el tiempo en que las muestras se incubaron, se pudo trabajar otro lote y otras muestras.
- Se contaron los días 7, 30 y 60 a partir de la inoculación de los microorganismos.

Quinto capítulo. Resultados.

Resultados

En las tablas 1-21 se observan los resultados obtenidos de pH, viscosidad, estabilidad y número de colonias, durante el desarrollo experimental para las tres formulaciones con los respectivos microorganismos de prueba.

En las tablas 28-30 aparecen los valores utilizados para realizar la optimización de la concentración y proporción de conservadores en las tres formas cosméticas.

Por otra parte, las gráficas 28-30 corresponden a la optimización considerando las 9 variables de respuesta.

SHAMPOO

Concentración Total %	Proporción Metiparabeno %	Resultados		
		pH	Viscosidad (cps)	Estabilidad
0.2500	50.00	5.3	1523	estable
0.2500	0.00	5.6	1602	estable
0.1000	0.00	5.7	2000	estable
0.1000	100.00	5.7	1938	estable
0.4000	0.00	5.8	2300	estable
0.4000	100.00	5.4	2459	estable
0.1000	50.00	5.6	2409	estable
0.2500	100.00	5.5	1626	estable
0.4000	50.00	5.8	1823	estable

Tabla No. 1

• Viscosidad: 1500 - 2500 unidades cps.

• pH: 5.3 - 5.8

• Estabilidad: 50 °C/16 h.

NOTA: Los datos de las muestras con diferentes concentraciones que se prepararon para el trabajo experimental se encontraron dentro de los rangos de viscosidad, pH y estabilidad proporcionados por la compañía cosmética.

Al hacer mención de "estable" se hace referencia a que no hay cambios de color, olor, apariencia o separación de fases, después de someter la muestra a la temperatura y tiempo indicados por la compañía cosmética.

SHAMPOO

Microorganismo de prueba: E. coli.

Concentración Total %	Proporción Metparabeno %	pH	No. de Colonias			Promedio		
			45 días	60 días	75 días	45 días	60 días	75 días
0.2500	50.00	5.3	24 16	10 8	—	20	9	—
0.2500	0.00	5.6	13 9	21 17	75 34	11	19	54.5
0.1000	0.00	5.7	150 162	179 184	225 264	156	181.5	244.5
0.1000	100.00	5.7	167 174	189 201	273 280	170.5	195	280
0.4000	0.00	5.8	—	—	—	—	—	—
0.4000	100.00	5.4	—	—	—	—	—	—
0.1000	50.00	5.6	153 178	192 183	241 259	185.5	187.5	250
0.2500	100.00	5.5	62 44	102 84	118 98	53	93	106
0.4000	50.00	5.8	—	—	—	—	—	—

Tabla No. 2

Todos los lotes cumplieron con las especificaciones proporcionadas por la compañía cosmética:

- Viscosidad: 1500 - 2500 unidades cps.
- Viscosímetro RTVD
- Aguja 4, vol. 20 r.p.m.
- Temp. 20 °C
- Tiempo 1 min.
- pH: 5.3 - 5.8
- Estabilidad: 50 °C/ 18 h.
- Color, olor y apariencia iguales al estándar.

SHAMPOO

Microorganismo de prueba: E. coli

Concentración Total %	Proporción Melanobeno %	Cambios Físicos 45 Días			Cambios Físicos 60 Días			Cambios Físicos 75 Días		
		Color	Olor	Apariencia	Color	Olor	Apariencia	Color	Olor	Apariencia
0.2500	50.00	--	--	---	+	+	---	+	+	---
0.2500	0.00	--	+	-	**	+++	+++	**	+++	+++
0.1000	0.00	+	+	++	**	**	+++	+++	+++	++++
0.1000	100.00	+	+	-	**	**	++++	+++	+++	++++
0.4000	0.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---
0.4000	100.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---
0.1000	50.00	+	+	-	**	**	++++	+++	+++	++++
0.2500	100.00	+	+	+	**	**	+++	**	**	+++
0.4000	50.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabla No. 3

- Igual a las especificaciones del estándar.

+ Mínima variación de las especificaciones del estándar.

++ Mayor variación de las especificaciones del estándar.

+++ ó ++++ Fuera de las especificaciones del estándar.

NOTA: Las diferencias en las especificaciones abarcan desde cambios ligeros de color, olor y apariencia hasta el cambio total de ellos.

SHAMPOO

Microorganismo de prueba: S. aureus

Concentración Total %	Proporción Meliparabeno %	pH	No. de Colonias			Promedio		
			45 días	60 días	75 días	45 días	60 días	75 días
0.2500	50.00	5.3	23 12	16 4	---	17.5	10	---
0.2500	0.00	5.6	15 9	21 13	34 27	12	17	30.5
0.1000	0.00	5.7	193 215	234 227	297 304	204	230.5	300.5
0.1000	100.00	5.7	173 225	198 215	223 231	199	208.5	227
0.4000	0.00	5.8	---	---	---	---	---	---
0.4000	100.00	5.4	---	---	---	---	---	---
0.1000	50.00	5.6	135 162	147 186	216 227	148.5	188.5	221.5
0.2500	100.00	5.5	96 81	112 92	137 128	89.5	102	132.5
0.4000	50.00	5.8	---	---	---	---	---	---

Tabla No. 4

Todos los productos cumplieron con las especificaciones proporcionadas por la compañía cosmética:

- Viscosidad 1500 - 2500 unidades cps
- Viscosímetro RTVD
- Agua 4, vel. 20 rpm
- Temp. 20 °C
- Tiempo 1 min
- pH 5.3 - 5.8
- Estabilidad 50 °C/ 16 h
- Color, olor y apariencia iguales a estándar

SHAMPOO

Microorganismo de prueba: *S. aureus*

Concentración Total %	Proporción Melipribano %	Cambios Físicos 45 Días			Cambios Físicos 60 Días			Cambios Físicos 75 Días		
		Color	Olor	Apariencia	Color	Olor	Apariencia	Color	Olor	Apariencia
0.2500	50.00	---	---	---	+	+	---	+	+	---
0.2500	0.00	---	+	+	++	+++	+++	++	+++	+++
0.1000	0.00	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	++++
0.1000	100.00	+	+	+	++	++	++++	+++	+++	++++
0.4000	0.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---
0.4000	100.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---
0.1000	50.00	+	+	+	++	++	++++	+++	+++	++++
0.2500	100.00	+	+	+	++	++	+++	++	++	+++
0.4000	50.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabla No. 5

- Igual a las especificaciones del estándar.

+ Mínima variación de las especificaciones del estándar.

++ Mayor variación de las especificaciones del estándar.

+++ ó ++++ Fuera de las especificaciones del estándar.

NOTA: Las diferencias en las especificaciones abarcan desde cambios ligeros de color, olor y apariencia hasta el cambio total de ellos.

SHAMPOO

Microorganismo de prueba: *C. albicans*

Concentración Total %	Proporción Microorganismo %	pH	No. de Colonias			Promedio		
			45 días	60 días	75 días	45 días	60 días	75 días
0.2500	50.00	5.3	31 18	22 8	---	24.5	15	---
0.2500	0.00	5.6	10 8	29 15	37 23	8	22	30
0.1000	0.00	5.7	171 182	193 212	231 247	176.5	202.5	239
0.1000	100.00	5.7	194 209	228 239	318 306	201.5	233.5	312
0.4000	0.00	5.8	---	---	---	---	---	---
0.4000	100.00	5.4	---	---	---	---	---	---
0.1000	50.00	5.6	161 187	179 197	397 421	174	180	404
0.2500	100.00	5.5	72 56	84 65	96 78	84	74.5	97
0.4000	50.00	5.8	---	---	---	---	---	---

Tabla No. 6

Todos los productos cumplieron con las especificaciones proporcionadas por la compañía cosmética:

- Viscosidad: 1500 - 2500 unidades cps.
- Viscosímetro RTVD
- Aguja 4, vel. 20 r.p.m.
- Temp. 20 °C
- Tiempo 1 min.
- pH: 5.3 - 5.8
- Estabilidad: 50 °C/ 16 h.
- Color, olor y apariencia iguales al estándar.

SHAMPOO

Microorganismo de prueba: *C. albicans*

Concentración Total %	Proporción Maltobenceno %	Cambios Físicos 45 Días			Cambios Físicos 60 Días			Cambios Físicos 75 Días		
		Color	Olor	Apariencia	Color	Olor	Apariencia	Color	Olor	Apariencia
0.2500	50.00	---	---	---	+	+	---	+	+	---
0.2500	0.00	---	-	+	++	+++	+++	++	+++	+++
0.1000	0.00	+	+++	+	++	++	+++	+++	+++	++++
0.1000	100.00	+	+++	+	+	++	++++	+++	+++	++++
0.4000	0.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---
0.4000	100.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---
0.1300	50.00	+	+	+	++	++	++++	+++	+++	++++
0.2500	100.00	+	+	+	++	++	+++	++	++	+++
0.4000	50.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabla No. 7

- Igual a las especificaciones del estándar.

+ Mínima variación de las especificaciones del estándar.

++ Mayor variación de las especificaciones del estándar.

+++ ó ++++ Fuera de las especificaciones del estándar.

NOTA: Las diferencias en las especificaciones se refieren a los cambios ligeros de color, olor y apariencia hasta el cambio total de ellos.

ACONDICIONADOR

Concentración Total %	Proporción Metiparabeno %	Resultados		
		pH	Viscosidad (cps)	Estabilidad
0.2500	50.00	3.53	7549	estable
0.2500	0.00	3.58	8234	estable
0.1000	0.00	3.50	6532	estable
0.1000	100.00	3.57	6500	estable
0.4000	0.00	3.54	7248	estable
0.4000	100.00	3.50	8233	estable
0.1000	50.00	3.52	10923	estable
0.2500	100.00	3.55	9827	estable
0.4000	50.00	3.53	7892	estable

Tabla No. 8

- Viscosidad: 6500 - 11000 unidades cps.
- pH: 3.5 - 4.5
- Estabilidad: 50 °C/16h.

NOTA: Los datos de las muestras con diferentes concentraciones que se prepararon para el trabajo experimental se encontraron dentro de los rangos de viscosidad, pH y estabilidad proporcionados por la compañía cosmética.

Al hacer mención de "estable" se hace referencia a que no hay cambios de color, olor, apariencia o separación de fases, después de someter la muestra a la temperatura y tiempo indicados por la compañía cosmética.

ACONDICIONADOR

Microorganismo de prueba: E. coli

Concentración Total %	Proporción Muestras %	pH	No. de Colonias			Promedio		
			7 días	30 días	60 días	7 días	30 días	60 días
C 2500	50 00	3.53	22 18	9 6	---	20	7.5	---
O 2500	0 00	3.58	93 114	125 137	140 148	103.5	131	144
O 1000	0 00	3.50	117 129	130 152	223 228	123	141	230.5
C 1000	100 00	3.57	131 149	162 177	215 242	139.5	169.5	226.5
O 4000	0 00	3.54	---	---	---	---	---	---
C 4000	100 00	3.50	---	---	---	---	---	---
C 1300	50 00	3.52	134 149	169 193	238 279	141.5	191	250.5
O 1500	100 00	3.55	97 96	118 113	130 132	91.5	115.5	134.5
O 4000	50 00	3.53	---	---	---	---	---	---

Table No. 0

Todos los lotes cumplieron con las especificaciones proporcionadas por la compañía cosmética:

- Viscosidad: 8500 - 11000 unidades cps.
- Viscosímetro FTVD
- Aguja 4, vol. 20 r.p.m.
- Temp. 20 °C
- Tiempo 1 min.
- pH: 3.5 - 4.5
- Estabilidad: 50 °C/ 16 h.
- Color, olor y apariencia iguales al estándar.

ACONDICIONADOR

Microorganismo de prueba: E. coli

Concentración Total %	Proporción Mediambeno %	Cambios Físicos 7 Días			Cambios Físicos 30 Días			Cambios Físicos 60 Días		
		Color	Olor	Apariencia	Color	Olor	Apariencia	Color	Olor	Apariencia
0.2500	50.00	---	---	---	*	*	---	*	*	---
0.2500	0.00	---	*	*	**	***	***	**	***	***
0.1000	0.00	*	*	**	**	**	***	***	***	****
0.1000	100.00	*	*	*	**	**	****	***	***	****
0.4000	0.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---
0.4000	100.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---
0.1000	50.00	*	*	*	**	**	****	***	***	****
0.2500	100.00	*	*	*	**	**	***	**	**	***
0.4000	50.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabla No. 10

- Igual a las especificaciones del estándar.

* Mínima variación de las especificaciones del estándar.

** Mayor variación de las especificaciones del estándar.

*** ó **** Fuera de las especificaciones del estándar.

NOTA: Las diferencias en las especificaciones abarcan desde cambios ligeros de color, olor y apariencia hasta el cambio total de ellos.

ACONDICIONADOR

Microorganismo de prueba: *S. aureus*

Concentración Total %	Proporción Molisaboro %	pH	No. de Colonias			Promedio		
			7 días	30 días	80 días	7 días	30 días	80 días
0.2500	50.00	3.53	18 12	4 0	---	15	5	---
0.2500	0.00	3.59	119 124	128 136	144 153	121.5	132	151.5
0.1000	0.00	3.50	132 128	152 161	199 215	130	156.5	208.5
0.1000	100.00	3.57	141 160	178 184	298 321	150	181	309.5
0.4000	0.00	3.54	---	---	---	---	---	---
0.4000	100.00	3.50	---	---	---	---	---	---
0.1000	50.00	3.52	151 174	189 193	351 384	162.5	191	267.5
0.2500	100.00	3.55	130 148	151 167	177 182	139	159	179.5
0.4000	50.00	3.53	---	---	---	---	---	---

Tabla No. 11

Todos los productos cumplen con las especificaciones proporcionadas por la compañía cosmética:

- Viscosidad: 6500 - 11000 unidades cps.
- Viscosímetro RTVD
- Aguja 4, vel. 20 r.p.m.
- Temp. 20 °C
- Tiempo 1 min.
- pH: 3.5 - 4.5
- Estabilidad: 50 °C/ 18 h.
- Color, olor y apariencia iguales al estándar.

ACONDICIONADOR

Microorganismo de prueba: *S. aureus*

Concentración Total %	Proporción Multiplicación %	Cambios Físicos 7 Días			Cambios Físicos 30 Días			Cambios Físicos 60 Días		
		Color	Olor	Apertura	Color	Olor	Apertura	Color	Olor	Apertura
0.2500	50.00	---	---	---	+	+	---	+	+	---
0.2500	0.00	---	-	+	**	***	***	**	***	***
0.1000	0.00	+	+	**	**	**	****	***	***	****
0.1000	100.00	+	+	+	**	**	****	***	***	****
0.4500	0.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---
0.4000	100.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---
0.1000	50.00	+	+	+	**	**	****	***	***	****
0.2500	100.00	+	-	+	**	**	***	**	**	***
0.4000	50.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabla No. 12

- Igual a las especificaciones del estándar.

+ Mínima variación de las especificaciones del estándar.

** Mayor variación de las especificaciones del estándar.

+++ ó ++++ Fuera de las especificaciones del estándar.

NOTA: Las diferencias en las especificaciones abarcan desde cambios ligeros de color, olor y apariencia hasta el cambio total de ellos.

ACONDICIONADOR

Microorganismo de prueba: *C. albicans*

Concentración Total %	Proporción Muestrero %	pH	No. de Colonias			Promedio		
			7 días	30 días	60 días	7 días	30 días	60 días
0.2500	50.00	3.53	30 19	16 8	---	24.5	12	---
0.2500	0.00	3.58	102 124	142 134	162 171	113	138	166.5
0.1000	0.00	3.50	119 138	127 152	249 321	128.5	139.5	285
0.1000	100.00	3.57	151 182	173 199	214 391	156.5	181	302.5
0.4000	0.00	3.54	---	---	---	---	---	---
0.4000	100.00	3.50	---	---	---	---	---	---
0.1000	50.00	3.52	140 159	183 178	352 439	153.5	170.5	422.5
0.2500	100.00	3.55	110 132	149 158	187 210	121	153.5	198.5
0.4000	50.00	3.53	---	---	---	---	---	---

Tabla No. 13

Todos los productos cumplieron con las especificaciones proporcionadas por la compañía cosmética:

- Viscosidad: 8500 - 11000 unidades cps.
- Viscosímetro RTVD
- Aguja 4, vel. 20 r.p.m.
- Temp. 20 °C
- Tiempo 1 min.
- pH: 3.5 - 4.5
- Estabilidad: 50 °C/ 16 h.
- Color, olor y apariencia iguales al estándar.

ACONDICIONADOR

Microorganismo de prueba: *C. albicans*

Concentración Total %	Proporción Múltiplicado %	Cambios Físicos 7 Días			Cambios Físicos 30 Días			Cambios Físicos 60 Días		
		Color	Olor	Apariencia	Color	Olor	Apariencia	Color	Olor	Apariencia
0.2500	50.00	---	---	---	+	+	---	+	+	---
0.2500	0.00	---	*	*	**	***	***	**	***	***
0.1000	0.00	+	+	**	**	**	***	***	***	****
0.1000	100.00	+	+	*	**	**	****	***	***	****
0.4000	0.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---
0.4000	100.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---
0.1000	50.00	+	+	*	**	**	****	***	***	****
0.2500	100.00	+	+	*	**	**	***	**	**	***
0.4000	50.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabla No. 14

- Igual a las especificaciones del estándar.

+ Mínima variación de las especificaciones del estándar.

** Mayor variación de las especificaciones del estándar.

*** ó **** Fuera de las especificaciones del estándar.

NOTA: Las diferencias en las especificaciones se basan en dos cambios ligeros de color, olor y apariencia hasta el cambio total de ellos.

CREMA

Concentración Total %	Proporción Meliparabeno %	Resultados		
		pH	Viscosidad (cps)	Estabilidad
0 2500	50 00	7.65	3758	estable
0 2500	0 00	7.70	4225	estable
0 1000	0 00	8.0	3429	estable
0 1000	100 00	7.63	4327	estable
0 4000	0 00	7.61	3078	estable
0 4000	100 00	7.02	3584	estable
0 1000	50 00	8.0	4452	estable
0 2500	100 00	7.67	3678	estable
0 4000	50 00	7.65	3082	estable

Tabla No. 15

- Viscosidad 3600 - 4500 unidades cps
- pH 7.6 - 8.0
- Estabilidad 50 °C/16 h

NOTA: Los datos de las muestras con diferentes concentraciones que se prepararon para el trabajo experimental se encuentran dentro de los rangos de viscosidad, pH y estabilidad proporcionados por la compañía comercial.

Al hacer mención de "estable" se hace referencia a que no hay cambios de color, olor, apariencia o separación de fases, después de someter a los tests de temperatura y tiempo indicados por la compañía comercial.

CREMA

Concentración Total %	Proporción Molliparebano %	Resultados		
		pH	Viscosidad (cps)	Estabilidad
0 2500	50 00	7.65	3758	estable
0 2500	0 00	7 70	4225	estable
0 1000	0 00	8 0	3429	estable
0 1000	100 00	7.63	4327	estable
0 4000	0 00	7.61	3678	estable
0 4000	100 00	7 98	3584	estable
0 1000	50 00	8 0	4450	estable
0 2500	100 00	7 67	3678	estable
0 4000	50 00	7 85	3682	estable

Table No. 15

- Viscosidad: 3500 - 4500 unidades cps
- pH: 7.6 - 8.0
- Estabilidad: 50 °C/16 h

NOTA: Los datos de las muestras con diferentes concentraciones que se prepararon para el trabajo experimental se encuentran dentro de los rangos de viscosidad, pH y estabilidad proporcionados por la compañía química.

Al hacer mención de "estable" se hace referencia a que no hay cambios de color, olor, apariencia o separación de fases, después de someterlo a los tests a la temperatura y tiempo indicados por la compañía química.

CREMA

Microorganismo de prueba: E. coli.

Concentración Total %	Proporción Microorganismo %	pH	No. de Colonias			Promedio		
			7 días	30 días	60 días	7 días	30 días	60 días
0.2500	50.00	7.85	28 21	12 7	—	24.5	95	—
0.2500	0.00	7.7	115 98	138 123	150 147	106.5	130.5	148.5
0.1000	0.00	8.0	230 251	273 303	408 392	240.5	268	400
0.1000	100.00	7.83	247 281	275 289	420 438	254	282	429
0.4000	0.00	7.01	—	—	—	—	—	—
0.4000	100.00	7.89	—	—	—	—	—	—
0.1000	50.00	8.0	216 223	241 237	306 315	219.5	259	310.5
0.2500	100.00	7.87	132 138	140 151	160 162	135	145.5	161
0.4000	50.00	7.85	—	—	—	—	—	—

Tabla No. 16

Todos los lotos cumplieron con las especificaciones proporcionadas por la compañía cosmética:

- Viscosidad: 3500 - 4500 unidades cps.
- Viscosímetro RTVD
- Aguja 4, vel. 20 r.p.m.
- Temp. 20 °C
- Tiempo 1 min.
- pH: 7.8 - 8.0
- Estabilidad: 50 °C/ 16 h.
- Color, olor y apariencia iguales al estándar.

CREMA

Microorganismo de prueba: E. coli

Concentración Total %	Proporción Mezcla banco %	Cambios Físicos 7 Días			Cambios Físicos 30 Días			Cambios Físicos 60 Días		
		Color	Olor	Apariencia	Color	Olor	Apariencia	Color	Olor	Apariencia
0,2500	50,00	—	—	—	+	+	—	+	+	—
0,2500	0,00	—	+	+	++	+++	+++	++	+++	+++
0,1000	0,00	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	++++
0,1000	100,00	+	+	+	++	++	++++	+++	+++	++++
0,4000	0,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,4000	100,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,1000	50,00	+	+	+	++	++	++++	+++	+++	++++
0,2500	100,00	+	+	+	++	++	+++	++	++	+++
0,4000	50,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabla No. 17

- Igual a las especificaciones del estándar.

+ Mínima variación de las especificaciones del estándar.

++ Mayor variación de las especificaciones del estándar.

+++ ó ++++ Fuera de las especificaciones del estándar.

NOTA: Las diferencias en las especificaciones abarcan desde cambios ligeros de color, olor y apariencia hasta el cambio total de ellos.

CREMA

Microorganismo de prueba: *S. aureus*

Concentración Total %	Proporción Maltoporano %	pH	No. de Colonias			Promedio		
			7 días	30 días	60 días	7 días	30 días	60 días
0.2500	50.00	7.65	32 41	15 28	---	38.5	21.5	---
0.2500	0.00	7.70	123 98	144 125	162 123	110.5	129.5	142.5
0.1000	0.00	8.0	321 295	407 326	465 401	308	366.5	434.5
0.1000	100.00	7.63	281 306	314 335	327 401	284.5	324.5	364
0.4000	0.00	7.61	---	---	---	---	---	---
0.4000	100.00	7.89	---	---	---	---	---	---
0.1000	50.00	8.0	234 257	321 353	398 412	245.5	337	405
0.2500	100.00	7.67	141 153	159 183	171 182	147	161	176.5
0.4000	50.00	7.65	---	---	---	---	---	---

Table No. 18

Todos los productos cumplieron con las especificaciones proporcionadas por la compañía cosmética:

- Viscosidad: 3500 - 4500 unidades cps.
- Viscosímetro RTVD
- Aguja 4, vol. 20 r.p.m.
- Temp. 20 °C
- Tiempo 1 min.
- pH: 7.6 - 8.0
- Estabilidad: 50 °C/ 18 h.
- Color, olor y apariencia iguales al estándar.

CREMA

Microorganismo de prueba: S. aureus

Concentración Total %	Proporción Metiparabeno %	Cambios Físicos 7 Días			Cambios Físicos 30 Días			Cambios Físicos 60 Días		
		Color	Olor	Apariencia	Color	Olor	Apariencia	Color	Olor	Apariencia
0.2500	50.00	—	—	—	+	+	—	+	+	—
0.2500	0.00	—	+	+	++	+++	+++	++	+++	+++
0.1000	0.00	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	++++
0.1000	100.00	+	+	+	++	++	++++	+++	+++	++++
0.4000	0.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.4000	100.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.1000	50.00	+	+	+	++	++	++++	+++	+++	++++
0.2500	100.00	+	+	+	++	++	+++	++	++	+++
0.4000	50.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabla No. 19

- Igual a las especificaciones del estándar.

+ Mínima variación de las especificaciones del estándar.

++ Mayor variación de las especificaciones del estándar.

+++ ó ++++ Fuera de las especificaciones del estándar.

NOTA: Las diferencias en las especificaciones abarcan desde cambios ligeros de color, olor y apariencia hasta el cambio total de ellos.

CREMA

Microorganismo de prueba: *C. albicans*

Concentración Total %	Proporción Maltodextrina %	pH	No. de Colonias			Promedio		
			7 días	30 días	60 días	7 días	30 días	60 días
0.2500	50.00	7.65	21 35	17 23	---	30	20	---
0.2500	0.50	7.70	138 115	151 139	174 143	126.5	145	161.5
0.1000	0.00	8.0	224 258	341 410	433 462	281	375.5	450
0.1000	100.00	7.63	276 301	361 312	483 473	288.5	336.5	481
0.4000	0.00	7.81	---	---	---	---	---	---
0.4000	100.00	7.89	---	---	---	---	---	---
0.1000	50.00	8.0	221 262	334 329	385 421	241.5	331.5	405
0.2500	100.00	7.67	161 148	178 183	199 213	164.5	180.5	205.5
0.4000	50.00	7.65	---	---	---	---	---	---

Tabla No. 20

Todos los productos cumplieron con las especificaciones proporcionadas por la compañía cosmética:

- Viscosidad: 3500 - 4500 unidades cps.
Viscosímetro RTVD
Aguja 4, vel. 20 r.p.m.
Temp. 20 °C
Tiempo 1 min.
- pH: 7.6 - 8.0
- Estabilidad: 50 °C/ 16 h.
- Color, olor y apariencia iguales al estándar.

CREMA

Microorganismo de prueba: *C. albicans*

Concentración Total %	Proporción Metiparabeno %	Cambios Físicos 7 Días			Cambios Físicos 30 Días			Cambios Físicos 60 Días		
		Color	Olor	Apariencia	Color	Olor	Apariencia	Color	Olor	Apariencia
0.2500	50.00	—	—	—	+	+	—	+	+	—
0.2500	0.00	—	+	+	++	+++	+++	++	+++	+++
0.1000	0.00	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	++++
0.1000	100.00	+	+	+	++	++	++++	+++	+++	++++
0.4000	0.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.4000	100.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.1000	50.00	+	+	+	++	++	++++	+++	+++	++++
0.2500	100.00	+	+	+	++	++	+++	++	++	+++
0.4000	50.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabla No. 21

- Igual a las especificaciones del estándar.

+ Mínima variación de las especificaciones del estándar.

++ Mayor variación de las especificaciones del estándar.

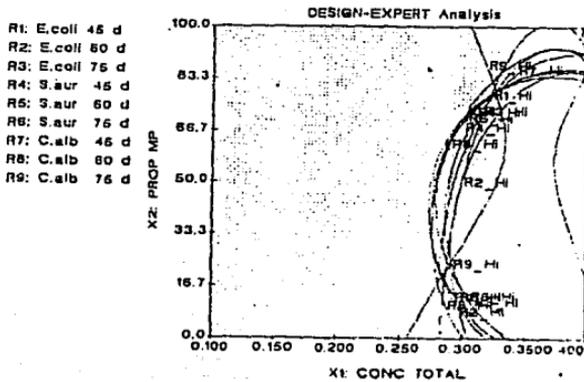
+++ ó ++++ Fuera de las especificaciones del estándar.

NOTA: Las diferencias en las especificaciones abarcan desde cambios ligeros de color, olor y apariencia hasta el cambio total de ellos.

VALORES DE OPTIMIZACION
PRODUCTO: SHAMPOO

RESPUESTA	UNIDADES	NIVEL BAJO	NIVEL ALTO	MODELO
R1: E. coli 45 DIAS	U.F.C.	-	5.000	CUADRATICO
R2: E. coli 60 DIAS	U.F.C.	-	5.000	CUADRATICO
R3: E. coli 75 DIAS	U.F.C.	-	5.000	CUADRATICO
R4: S. aureus 45 DIAS	U.F.C.	-	5.000	CUADRATICO
R5: S. aureus 60 DIAS	U.F.C.	-	5.000	CUADRATICO
R6: S. aureus 75 DIAS	U.F.C.	-	5.000	CUADRATICO
R7: C. albicans 45 DIAS	U.F.C.	-	5.000	CUADRATICO
R8: C. albicans 60 DIAS	U.F.C.	-	5.000	CUADRATICO
R9: C. albicans 75 DIAS	U.F.C.	-	5.000	CUADRATICO

Tabla No. 28

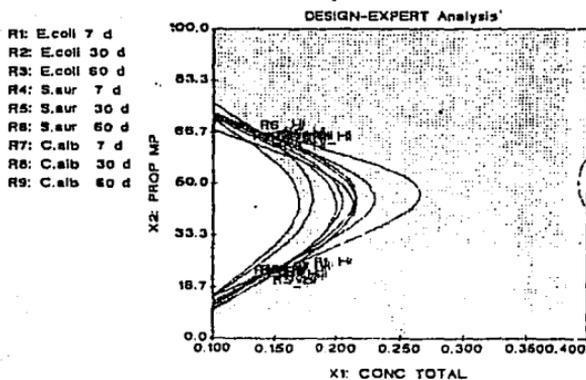


gráfica No. 28

VALORES DE OPTIMIZACION PRODUCTO: ACONDICIONADOR

RESPUESTA	UNIDADES	NIVEL BAJO	NIVEL ALTO	MODELO
R1: E. coli 7 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO
R2: E. coli 30 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO
R3: E. coli 60 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO
R4: S. aureus 7 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO
R5: S. aureus 30 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO
R6: S. aureus 60 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO
R7: C. albicans 7 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO
R8: C. albicans 30 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO
R9: C. albicans 60 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO

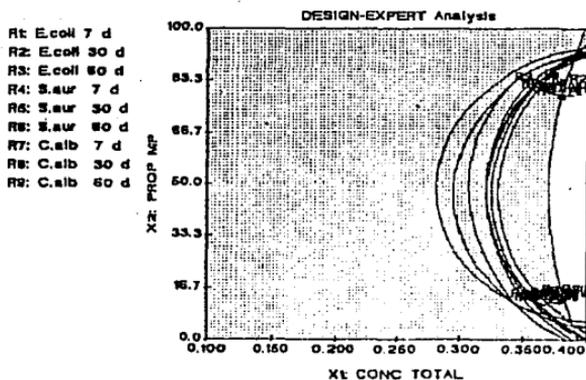
Tabla No. 29



VALORES DE OPTIMIZACION PRODUCTO: CREMA PARA MANOS Y CUERPO

RESPUESTA	UNIDADES	NIVEL BAJO	NIVEL ALTO	MODELO
R1: E. coli 7 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO
R2: E. coli 30 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO
R3: E. coli 60 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO
R4: S. aureus 7 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO
R5: S. aureus 30 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO
R6: S. aureus 60 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO
R7: C. albicans 7 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO
R8: C. albicans 30 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO
R9: C. albicans 60 DIAS	U.F.C.	-	10.000	CUADRATICO

Tabla No. 30



gráfica No. 30

Sexto capítulo. Análisis de resultados y conclusiones.

Análisis de resultados.

En todos los casos (figuras 1a-27a) se observa que existe un buen ajuste de los datos experimentales al modelo estadístico obtenido en cada caso, ya que la mayoría de los puntos se acercan a la línea.

En las figuras 1b-27b se muestran las gráficas de tendencia obtenidas mediante el programa estadístico de computadora.

Para shampoo y crema para manos y cuerpo, se observa que al aumentar la concentración total de conservadores, la eficiencia de éstos es mayor sin que afecte significativamente la proporción de metilparabeno y propilparabeno.

En el caso del acondicionador, la proporción de cada uno de los conservadores tiene un papel muy importante; obteniéndose mejores resultados aproximadamente en proporciones 50:50, mientras que la concentración total no tiene una influencia apreciable.

- Producto: Shampoo
- Microorganismo de prueba: E. coli
- Tiempo: 45 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

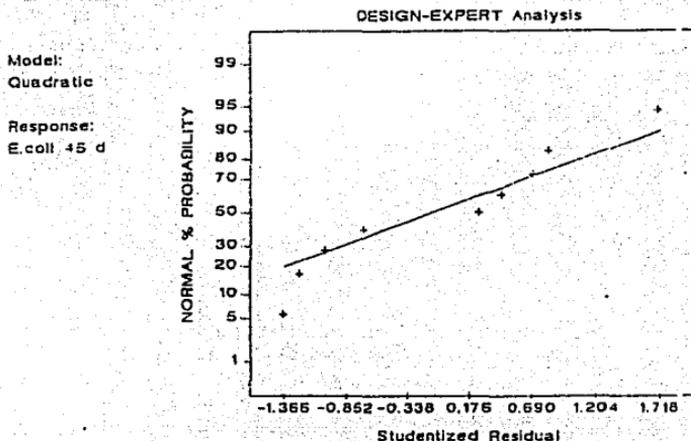


Fig. 1a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

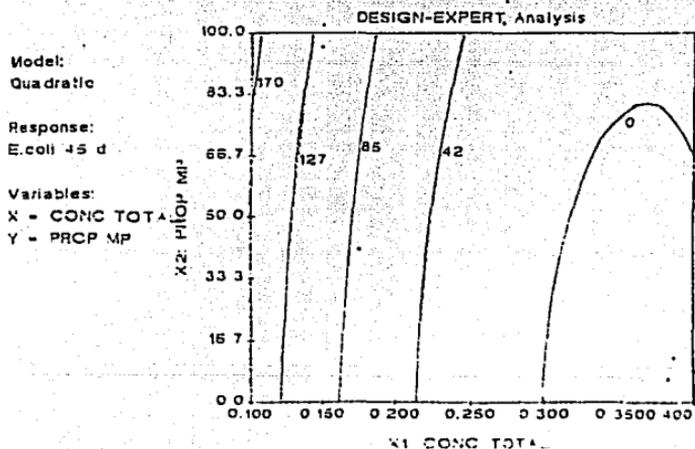


Fig. 1b

- Producto: Shampoo
- Microorganismo de prueba: E. coli
- Tiempo: 60 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

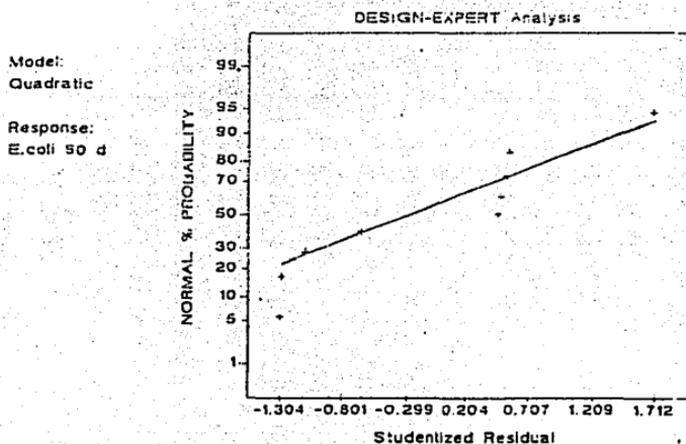


Fig. 2a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

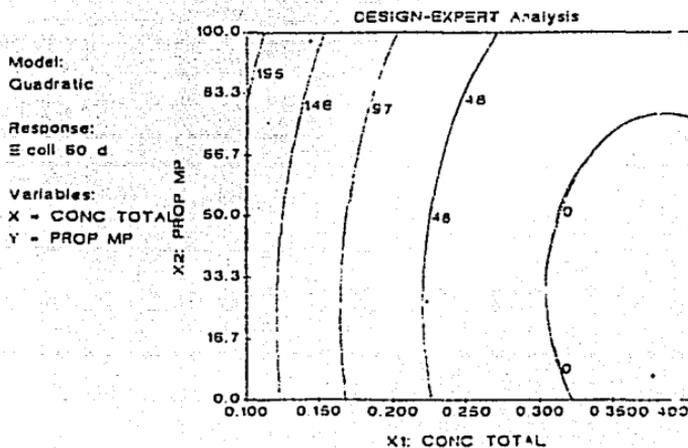


Fig. 2b

- Producto: Shampoo
- Microorganismo de prueba: *E. coli*
- Tiempo: 75 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

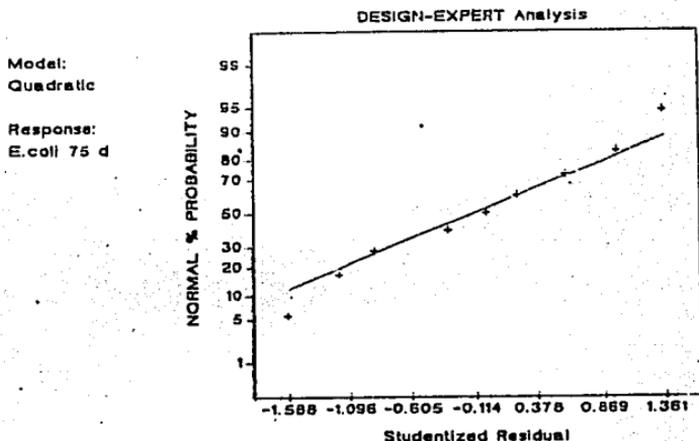


Fig. 3a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

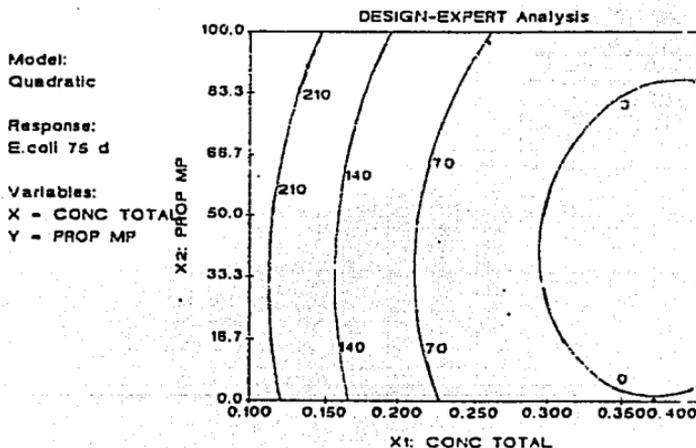


Fig. 3b

- Producto: Shampoo
- Microorganismo de prueba: *S. aureus*
- Tiempo: 45 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

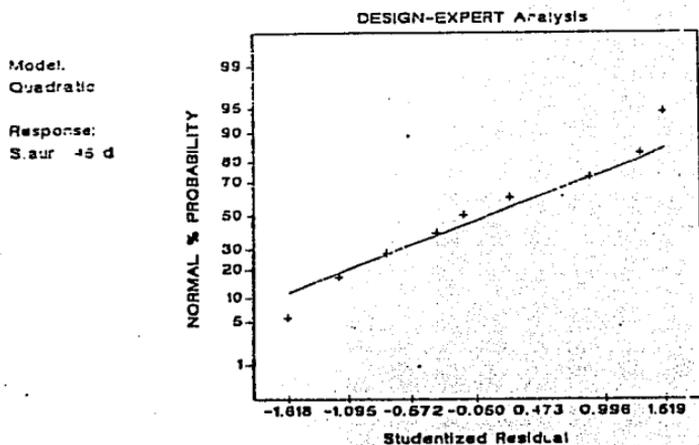


Fig. 4a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

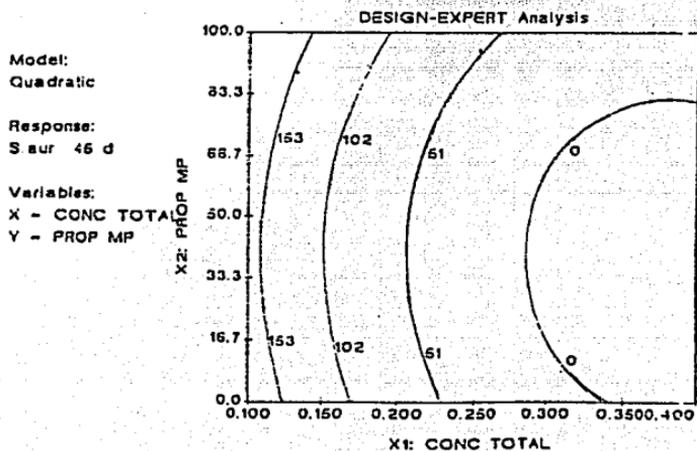


Fig. 4b

- Producto: Shampoo
- Microorganismo de prueba: S. aureus
- Tiempo: 60 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

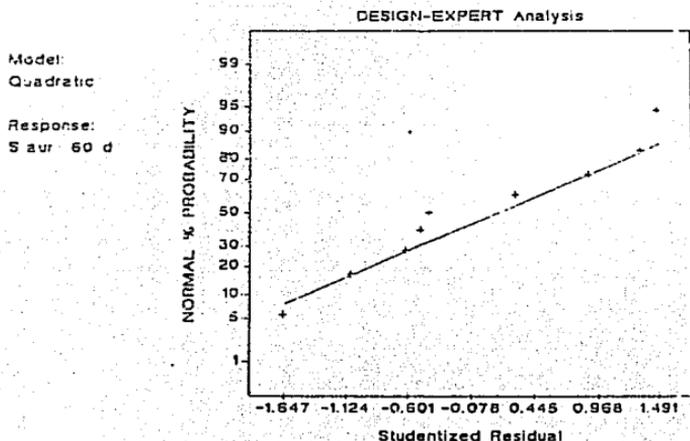


Fig. 5a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

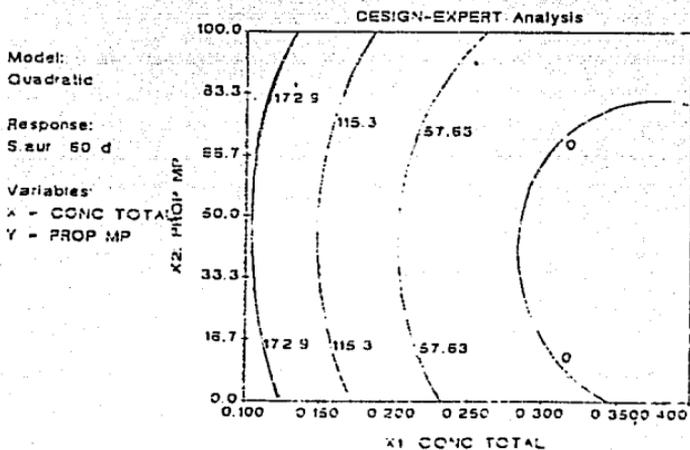


Fig. 5b

- **Producto:** Shampoo
- **Microorganismo de prueba:** *S. aureus*
- **Tiempo:** 75 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

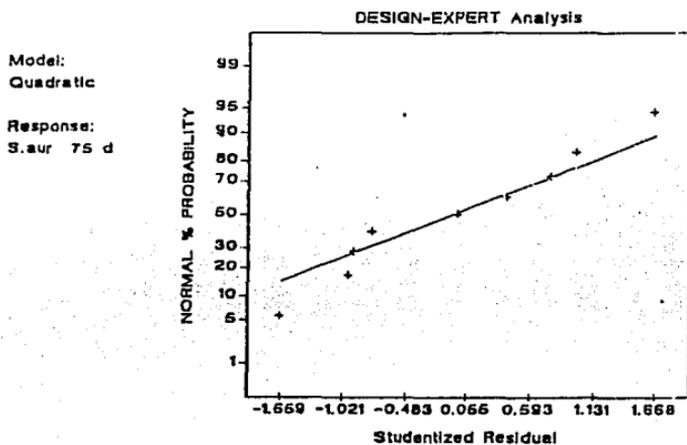


Fig. 6a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

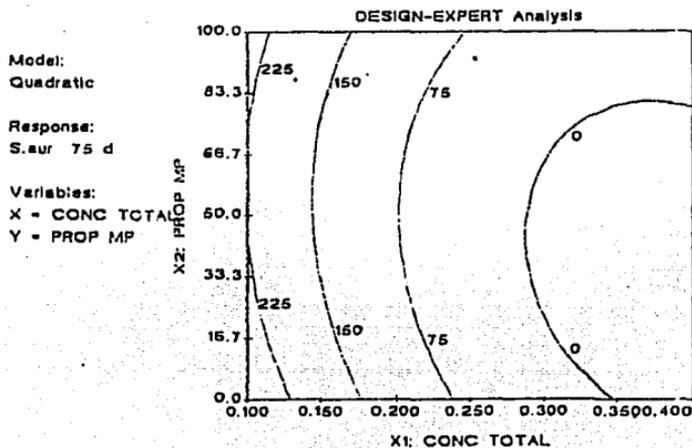


Fig. 6b

- **Producto:** Shampoo
- **Microorganismo de prueba:** C. albicans
- **Tiempo:** 45 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

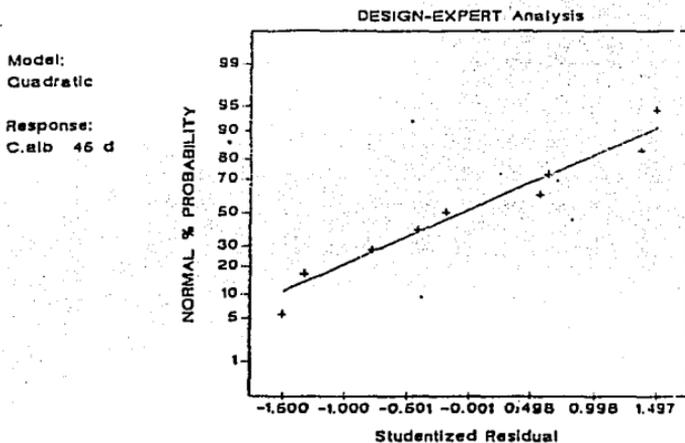


Fig. 7a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

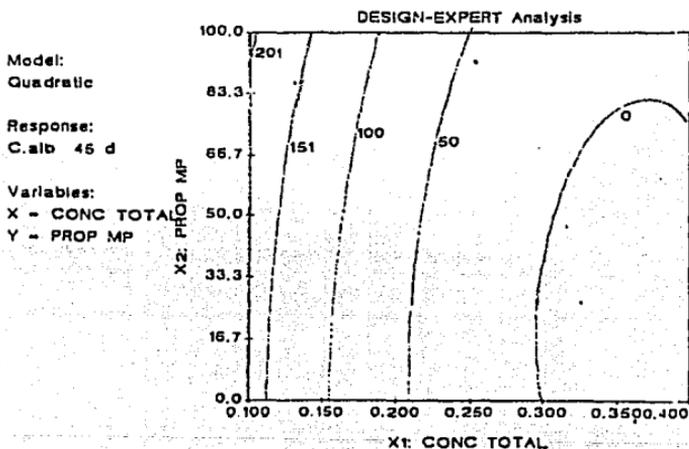


Fig. 7b

- Producto: Shampoo
- Microorganismo de prueba: *C. albicans*
- Tiempo: 60 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

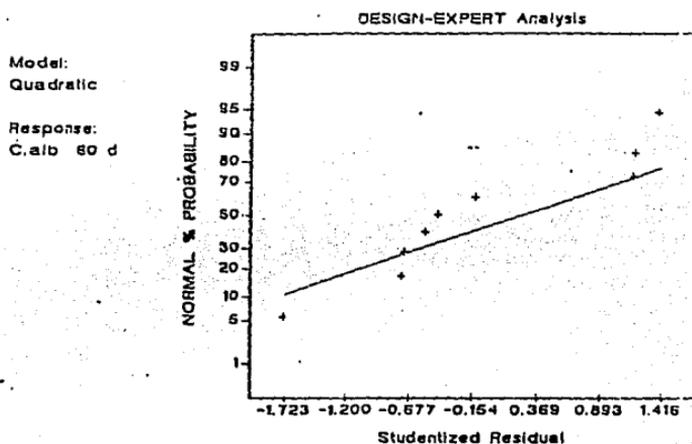


Fig. 8a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

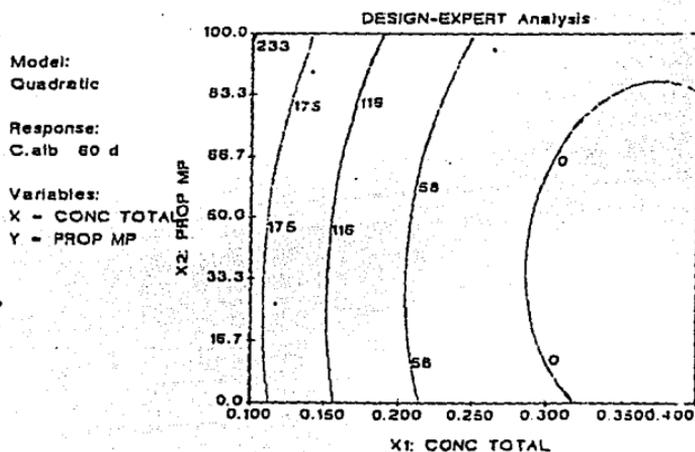


Fig. 8b

- **Producto:** Shampoo
- **Microorganismo de prueba:** *C. albicans*
- **Tiempo:** 75 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

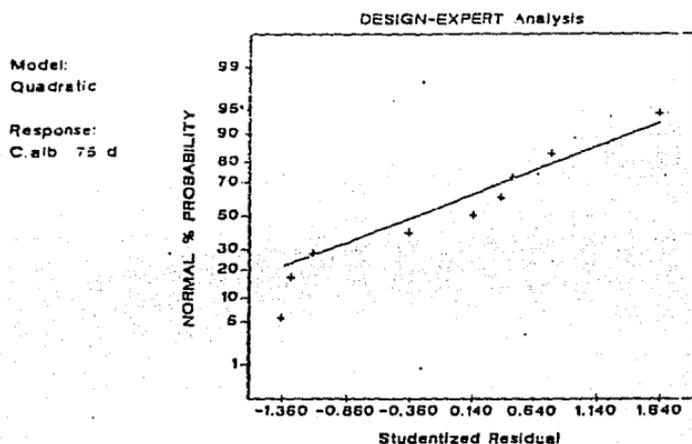


Fig. 9a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

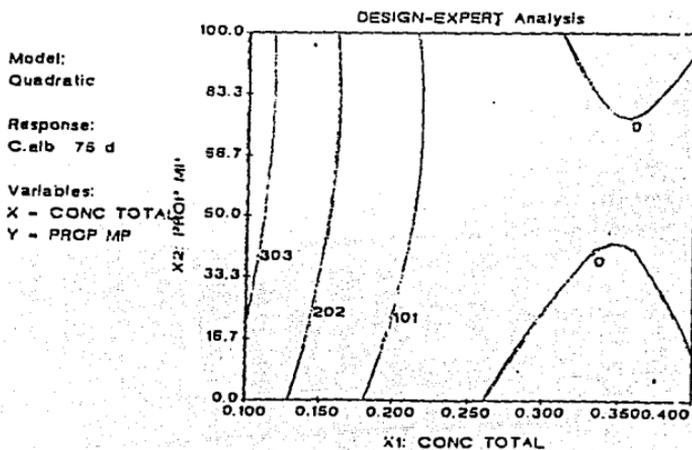


Fig. 9b

- Producto: Acondicionador
- Microorganismo de prueba: E. coli
- Tiempo: 7 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

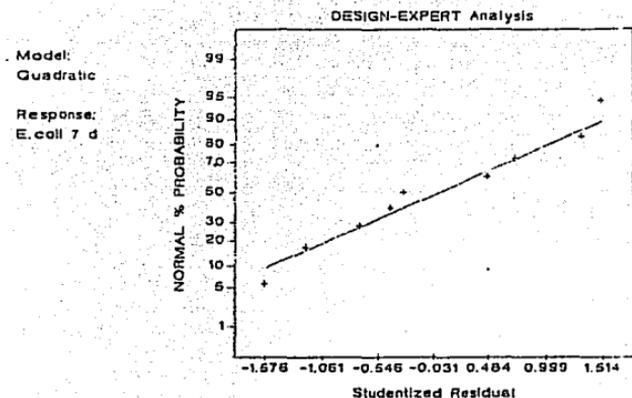


Fig. 10a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

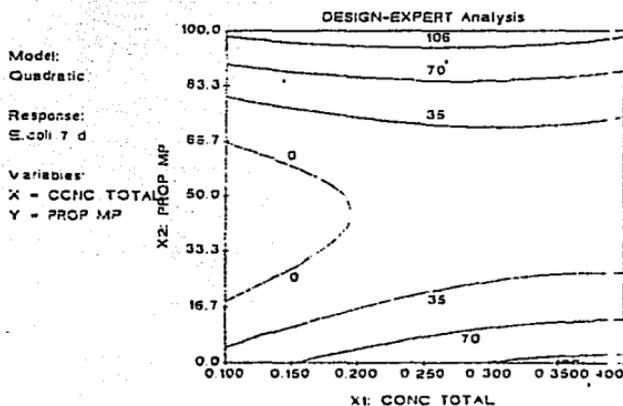


Fig. 10b

- **Producto:** Acondicionador
- **Microorganismo de prueba:** E. coli
- **Tiempo:** 30 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

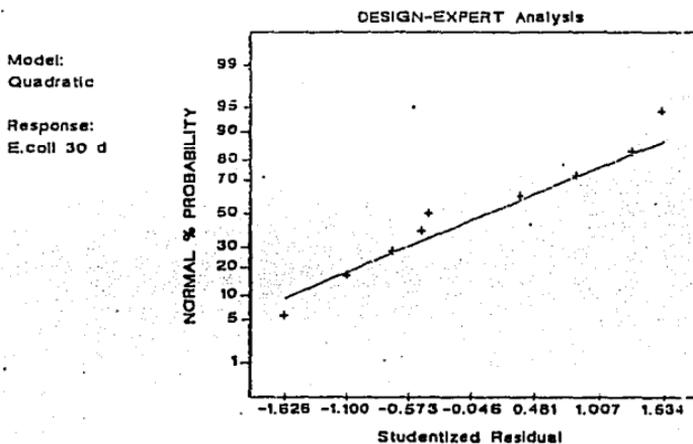


Fig. 11a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

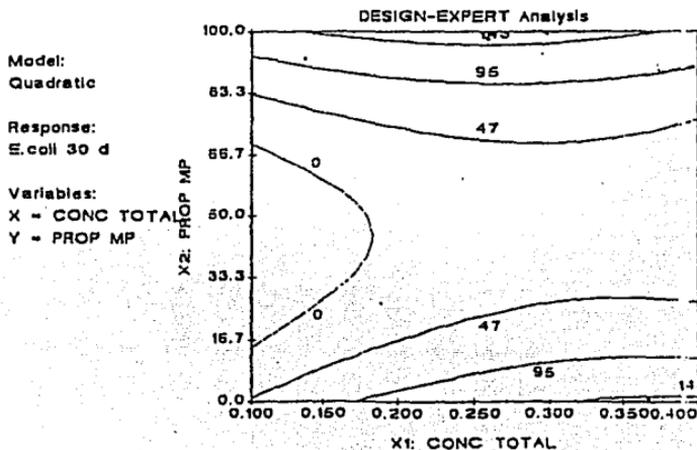


Fig. 11b

- **Producto:** Acondicionador
- **Microorganismo de prueba:** *E. coli*
- **Tiempo:** 60 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

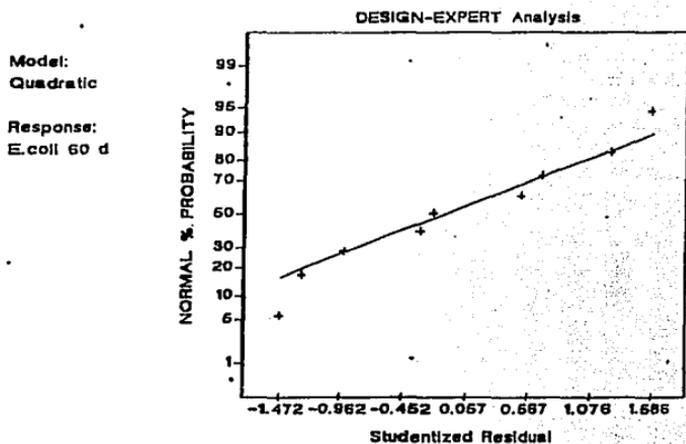


Fig. 12a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

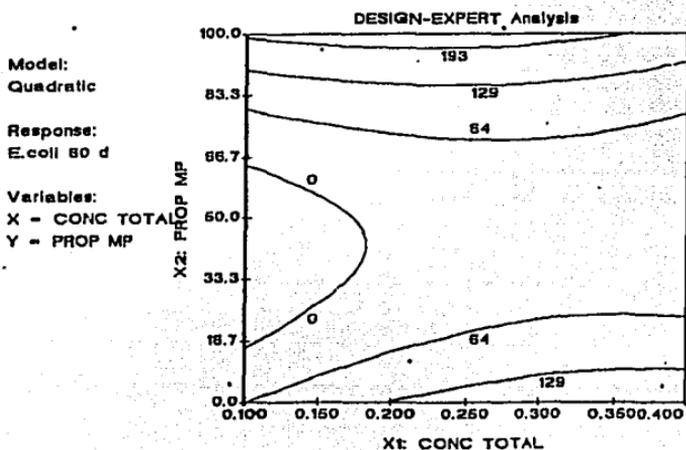


Fig. 12b

- **Producto:** Acondicionador
- **Microorganismo de prueba:** S. aureus
- **Tiempo:** 7 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

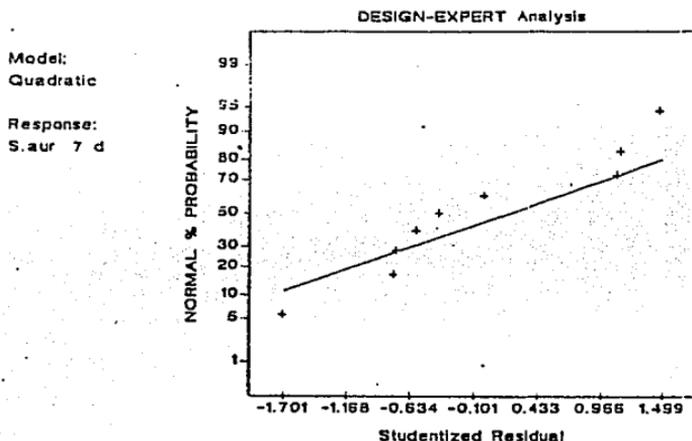


Fig. 13a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

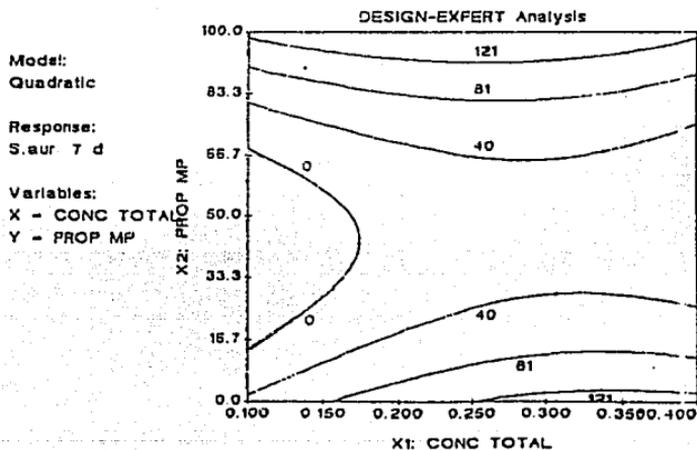


Fig. 13b

- **Producto:** Acondicionador
- **Microorganismo de prueba:** S. aureus
- **Tiempo:** 30 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

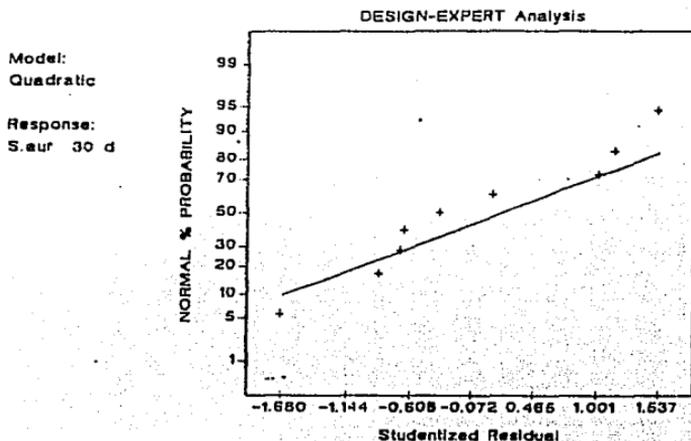


Fig. 14a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

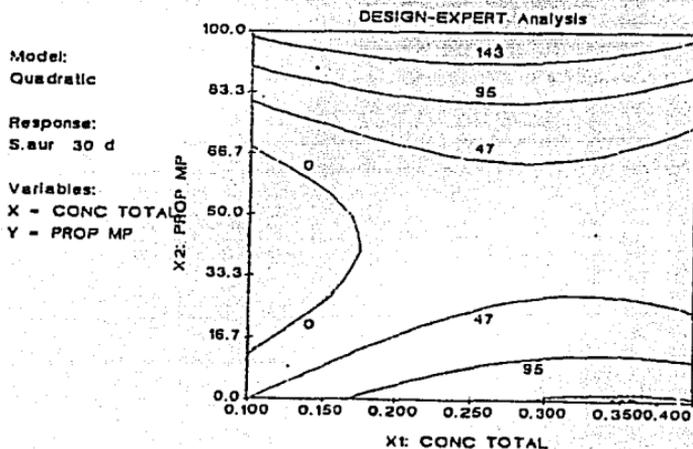


Fig. 14b

- Producto: Acondicionador
- Microorganismo de prueba: *S. aureus*
- Tiempo: 60 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

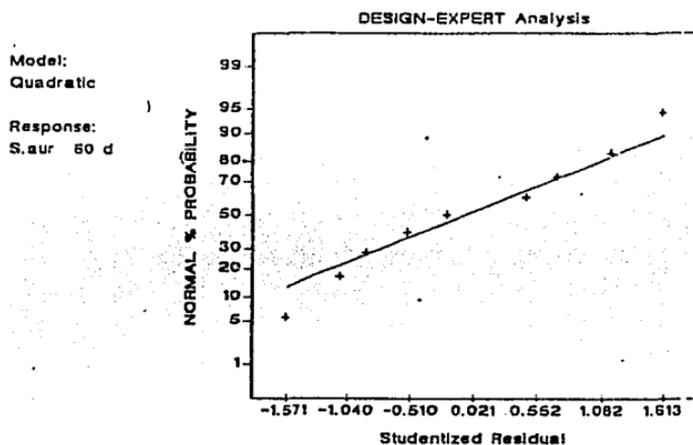


Fig. 15a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

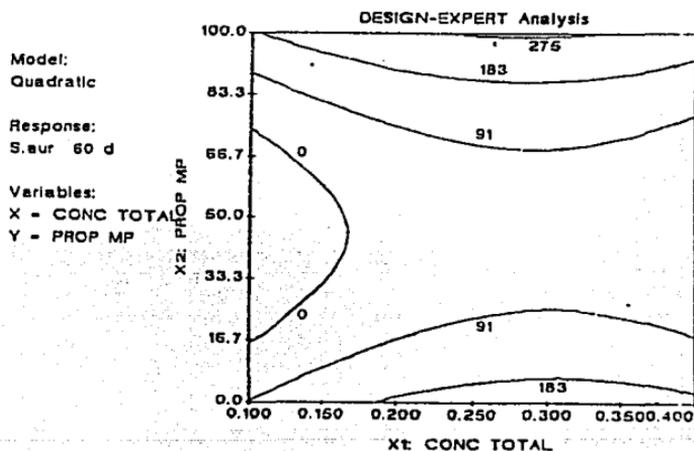


Fig. 15b

- **Producto:** Acondicionador
- **Microorganismo de prueba:** *C. albicans*
- **Tiempo:** 7 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

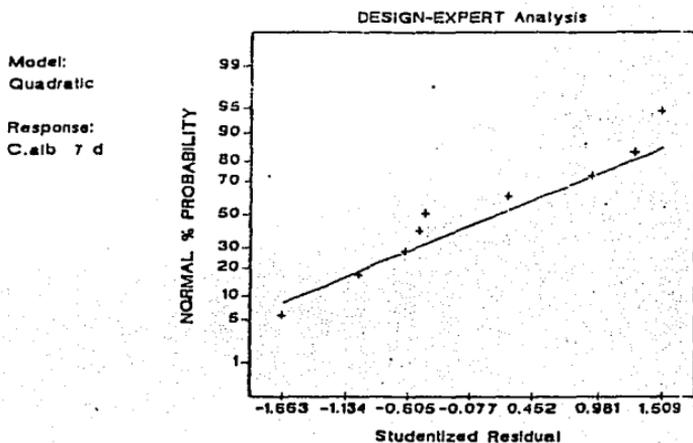


Fig. 16a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

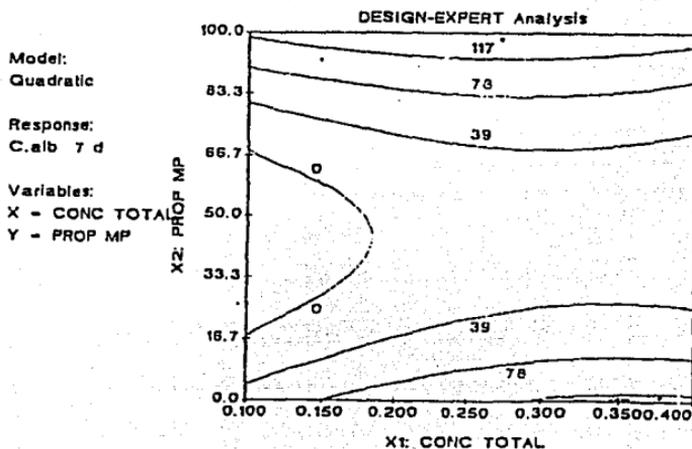


Fig. 16b

- Producto: Acondicionador
- Microorganismo de prueba: *C. albicans*
- Tiempo: 30 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

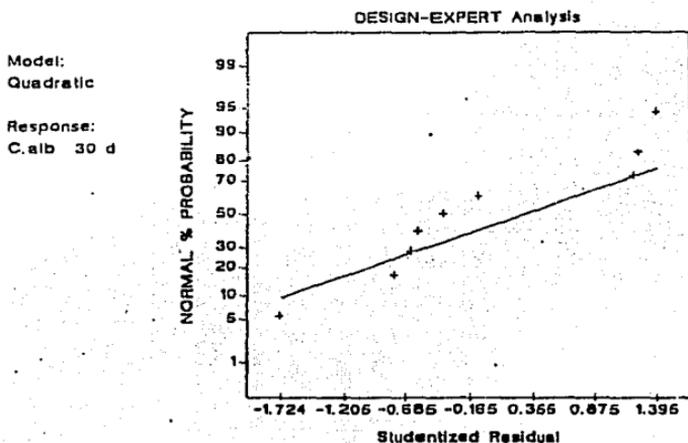


Fig. 17a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

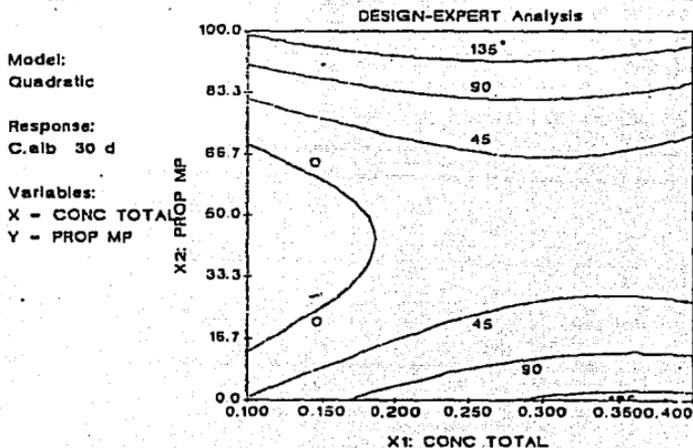


Fig. 17b

- **Producto:** Acondicionador
- **Microorganismo de prueba:** *C. albicans*
- **Tiempo:** 60 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

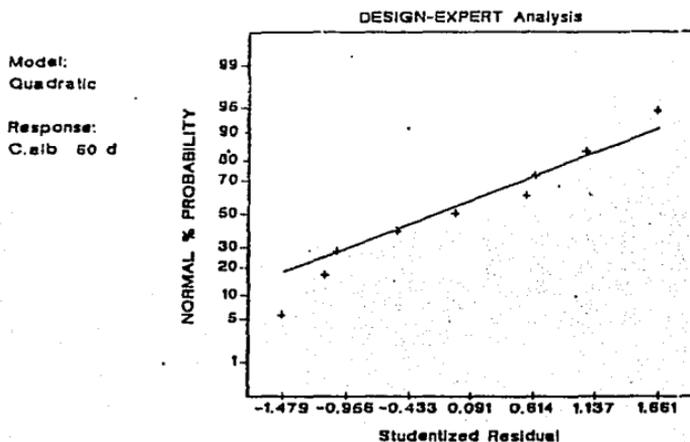


Fig. 18a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

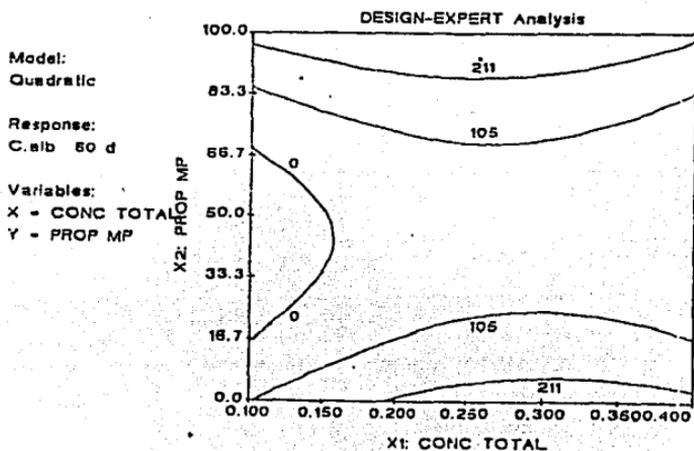


Fig. 18b

- Producto: Crema para manos y cuerpo
- Microorganismo de prueba: E. coli
- Tiempo: 7 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

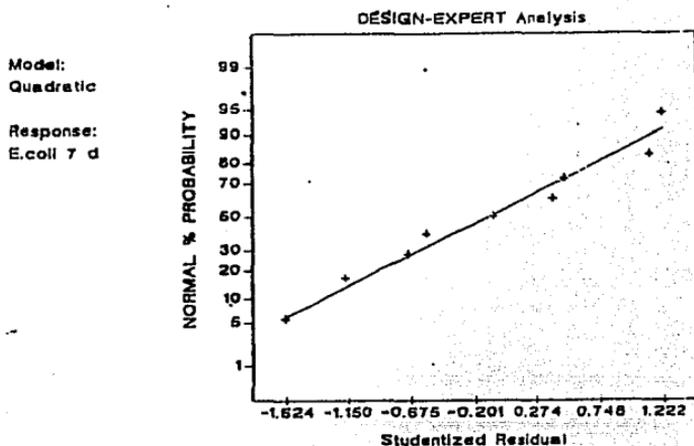


Fig. 19a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

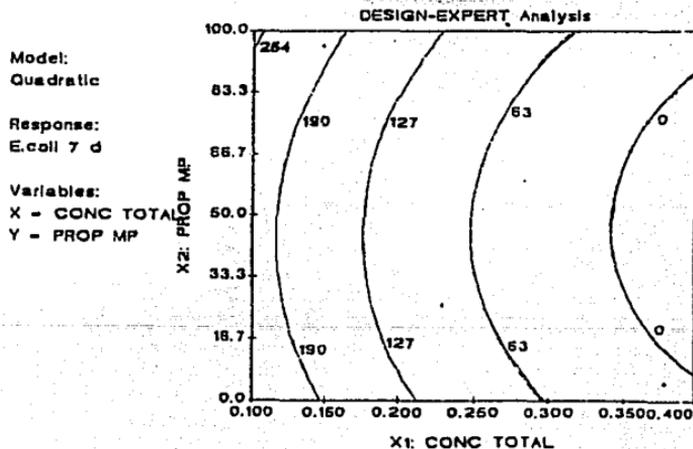


Fig. 19b

- **Producto:** Crema para manos y cuerpo
- **Microorganismo de prueba:** E. coli
- **Tiempo:** 30 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

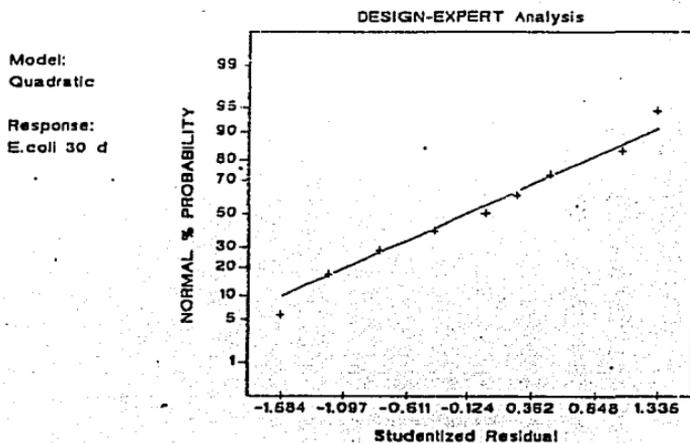


Fig. 20a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

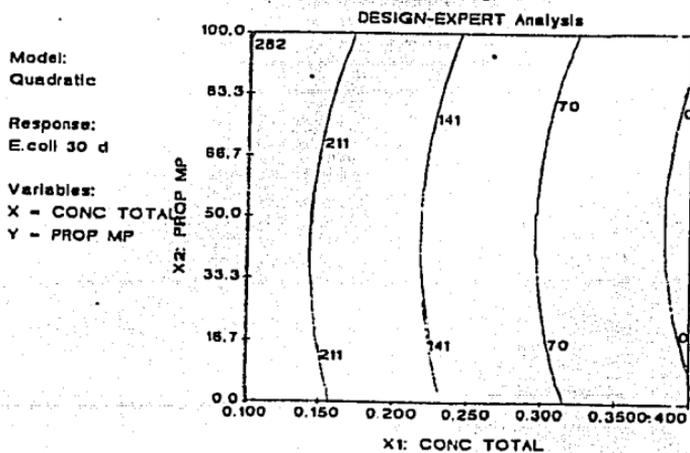


Fig. 20b

- **Producto:** Crema para manos y cuerpo
- **Microorganismo de prueba:** *E. coli*
- **Tiempo:** 60 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

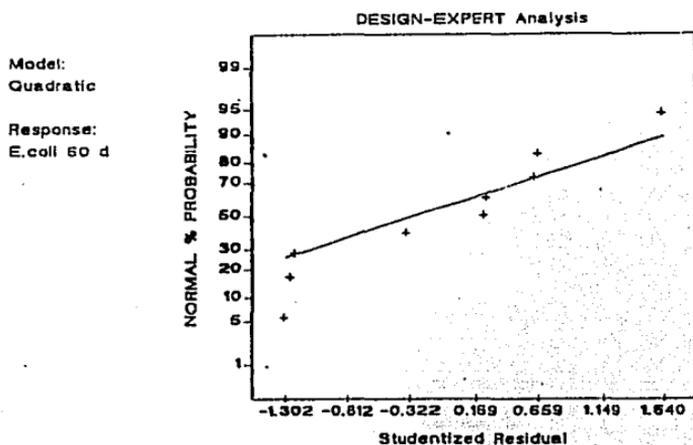


Fig. 21a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

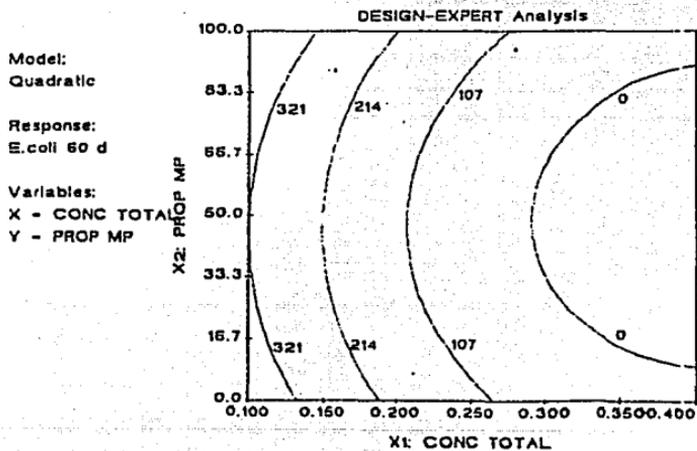


Fig. 21b

- **Producto:** Crema para manos y cuerpo
- **Microorganismo de prueba:** S. aureus
- **Tiempo:** 7 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

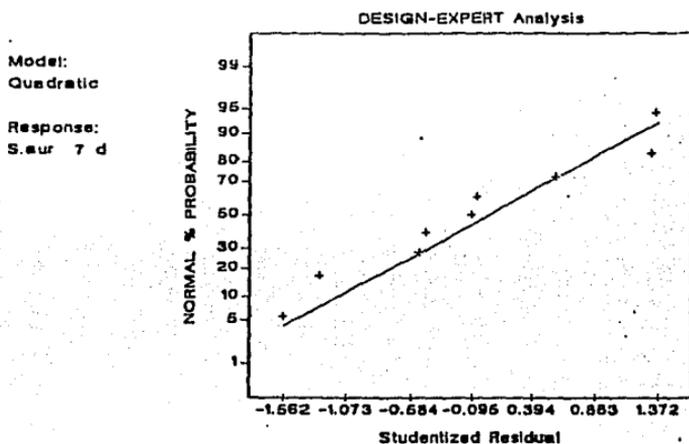


Fig. 22a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

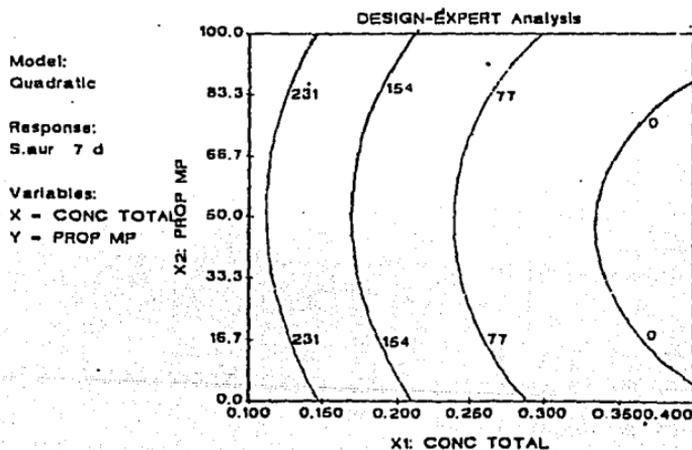


Fig. 22b

- **Producto:** Crema para manos y cuerpo
- **Microorganismo de prueba:** S. aureus
- **Tiempo:** 30 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

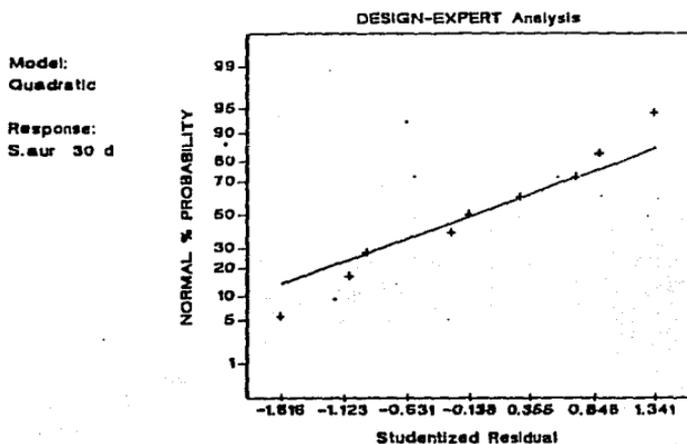


Fig. 23a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

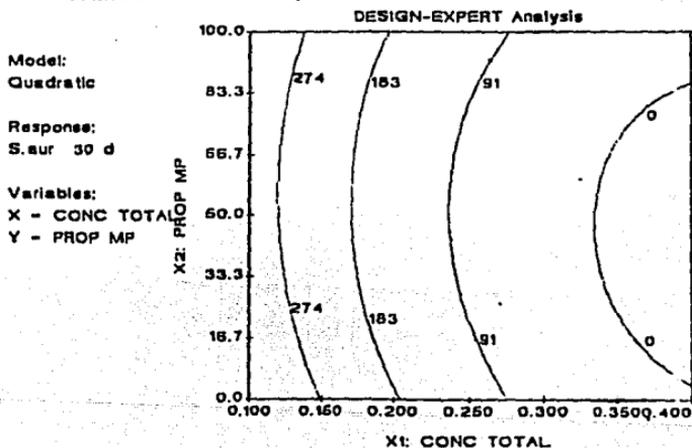


Fig. 23b

- **Producto:** Crema para manos y cuerpo
- **Microorganismo de prueba:** S. aureus
- **Tiempo:** 60 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

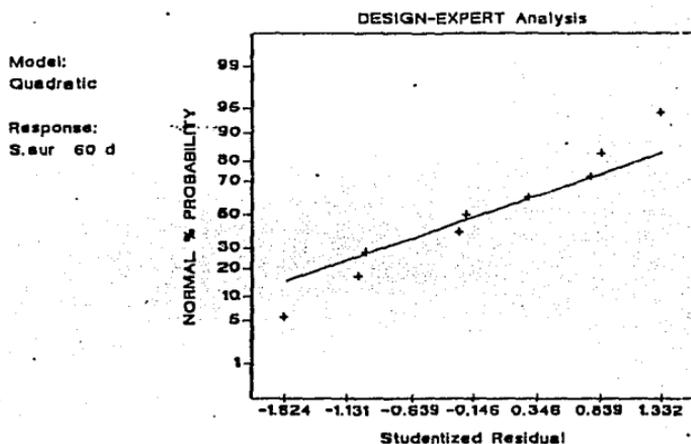


Fig. 24a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

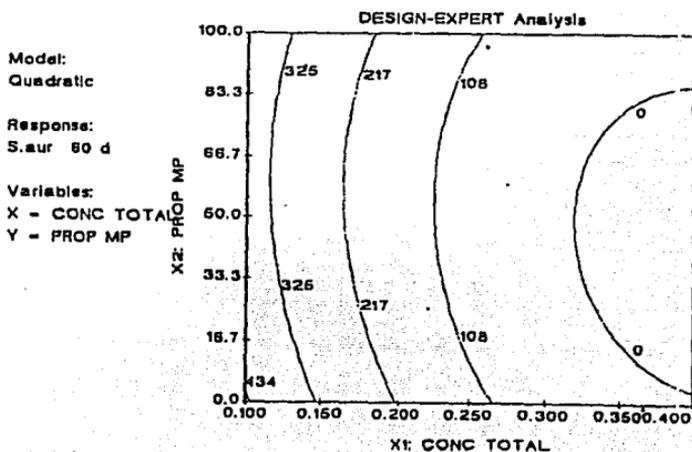


Fig. 24b

- Producto: Crema para manos y cuerpo
- Microorganismo de prueba: *C. albicans*
- Tiempo: 7 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

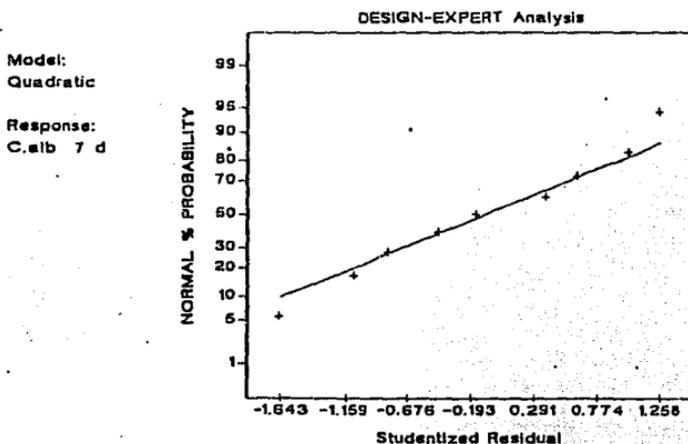


Fig. 25a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

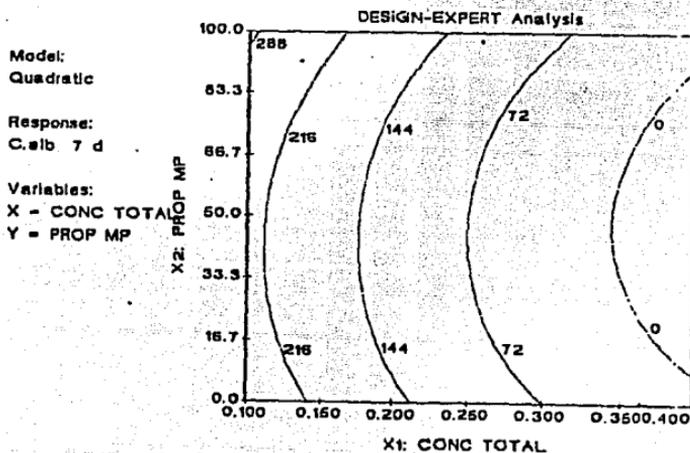


Fig. 25b

- **Producto:** Crema para manos y cuerpo
- **Microorganismo de prueba:** *C. albicans*
- **Tiempo:** 30 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

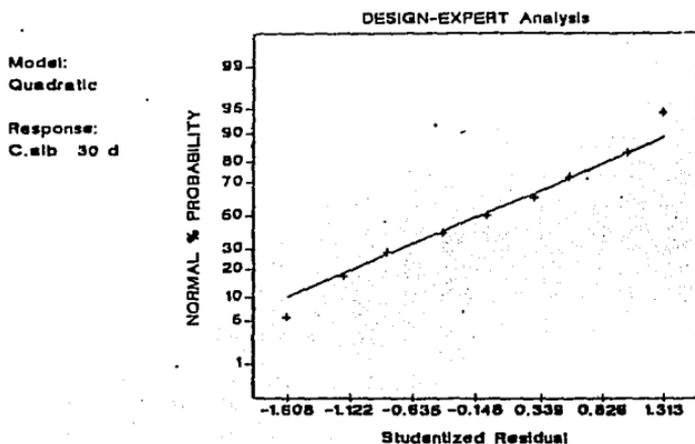


Fig. 26a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

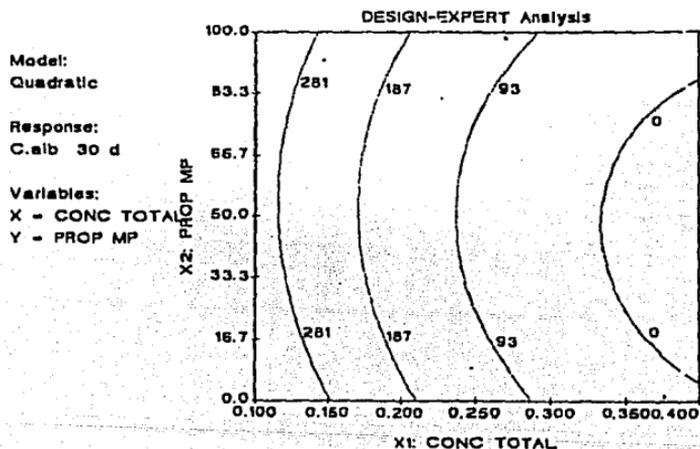


Fig. 26b

- Producto: Crema para manos y cuerpo
- Microorganismo de prueba: *C. albicans*
- Tiempo: 60 días.

Gráfica de % de probabilidad normal vs residuales.

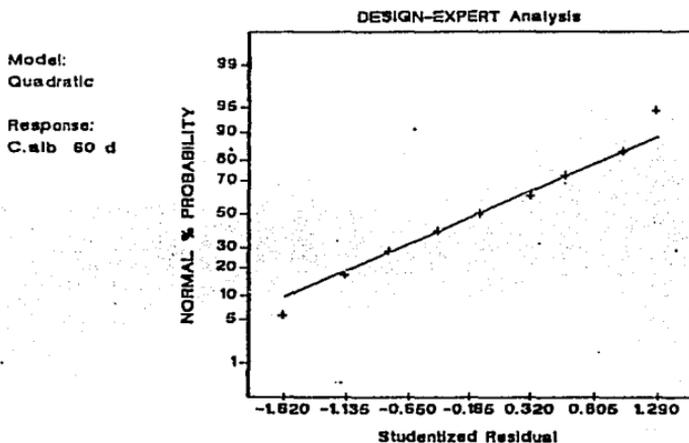


Fig. 27a

Gráfica de tendencia para la variable de respuesta U.F.C.

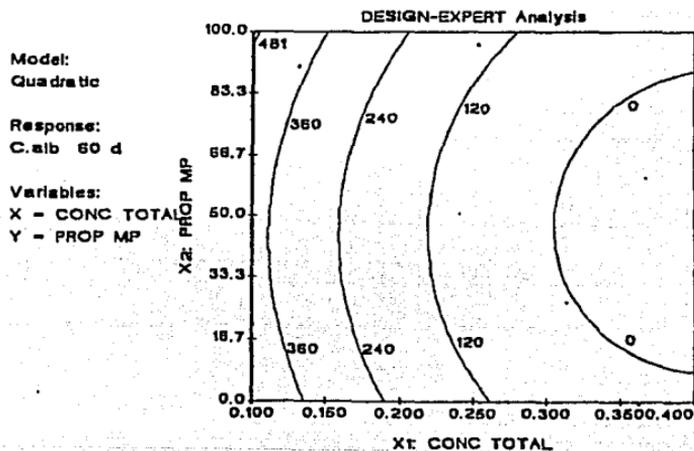


Fig. 27b

Conclusiones.

Después de examinar los parámetros que tienen que ser tomados en cuenta al seleccionar la concentración óptima de 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.

I) La concentración y proporción óptima de los conservadores (metilparabeno y propilparabeno) depende de la forma cosmética en cuestión.

II) Las tablas de valores de optimización así como sus respectivas gráficas, para cada uno de los productos cosméticos en estudio con cada uno de los microorganismos de prueba de acuerdo a los resultados analizados en conjunto, formaron un área en la que es posible determinar la concentración óptima de cada uno de ellos.

Este punto se determina localizando el "centro" de ésta área. Por lo que la concentración óptima para:

1) Shampoo es de 0.34% en una proporción de 30% de metilparabeno y 70% de propilparabeno.

2) Acondicionador es de 0.13% en una proporción de 40% de metilparabeno y 60% de propilparabeno.

3) Crema para manos y cuerpo es de 0.40% en una proporción de 50% de metilparabeno y 50% de propilparabeno.

Por lo anteriormente observado, se puede concluir que la concentración óptima es aquella en la que se encuentra un sistema conservador bien establecido y que por consiguiente, no permitirá el desarrollo microbiano en un producto cosmético en un tiempo establecido, ya sea como vida de anaquel o en pruebas para reto microbiológico.

Séptimo capítulo. Glosario.

GLOSARIO.

Antiséptico: Sustancia con actividad bacteriostática.

ATCC: (American Type Culture Collection); Organización privada que colecciona, conserva y distribuye cultivos vivos de microorganismos y células animales.

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.

Buenas Prácticas de Manufactura (Por sus siglas en inglés de "Good Manufacturing Practices"): Son las regulaciones o principios básicos y fundamentales sobre las cuales debe cimentarse la Manufactura, Producción y Empaque de los productos de tal manera que cada uno de ellos tenga la Calidad requerida.

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.

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

CTFA: (The Cosmetic, Toiletries and Fragrance Association); Organización que regula y controla por medio de normas las materias y materiales que se utilizan en la fabricación y consumo de cosméticos.

Empaque primario: Es el que está en contacto directo con el producto; puede ser vidrio, plástico u otro material.

FDA: (Food and Drug Administration): Organización que regula y controla por medio de normas los aditivos que se utilizan en la elaboración y consumo de productos farmacéuticos y alimentarios.

Límites microbianos: Es el número mínimo permitido por la CTFA 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.

Patógeno: Agente productor o causante de enfermedad.

Piógeno: Agente productor de pus.

Reacciones alérgicas: Conjunto de fenómenos de carácter respiratorio, nervioso o eruptivo producidos por la absorción de ciertas sustancias que dan al organismo una sensibilidad especial ante una nueva acción de tales sustancias aún en cantidades mínimas.

Sanitizar: Es la reducción del contenido microbiano a niveles aceptables.

Tensoactivos: Son sustancias que aumentan o disminuyen la tensión superficial. Un tensoactivo está formado por una parte polar y otra no polar, por lo que se dice que son anfífilos.

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-acetona, por lo tanto se colorean por contraste.

Octavo Capítulo. Bibliografía.

BIBLIOGRAFIA.

1. Blachman, Uzy and Elowitz-Jeffes.
"Microbiology control of microbiological contamination of non-sterile pharmaceuticals and cosmetics in the U.S.A."
In joint Symposium of Microbiological Control, Oxford, Blackwell 1971.
2. Brock D. Thomas.
"Biology of Microorganisms".
Sixth Edition, Prince Hall, (1991).
3. C. Curry, Janet.
"A history of cosmetic microbiology".
Cosmetic technology, February, 1983.
4. Collins, C.H.; Lyne, P.M.
"Métodos microbiológicos".
5ª Edición, Editorial Acribia (1989).
5. Cosmetic, Toiletries and Fragrance Association, Inc.
"Guía para la limpieza y sanitización de la Industria cosmética".
CTFA, 1983.
6. Cosmetic Toiletries and Fragrance Association, Inc.
"Microbiological Limit Guidelines for Cosmetics and toiletries".
CTFA, 1973.
7. Crockford, H.D.
"Fundamentos de Físicoquímica".
Ed. CECSA, 3ª Impresión.
8. Decker, R.L. and Wenninger, J.A.
"Preservatives Frequency of the use in Cosmetic formulas as disclosed FDA".
Cosmetics and toiletries, Vol. 105, (45-47), March 1990.
9. Goodman y Gilman.
"Las bases farmacológicas de la terapéutica".
Ed. Médica panamericana (8ª Edición).
10. Helman, José.
"Farmacología teórica y práctica".
Compañía Editorial Continental, S.A., México 1981.
11. Holt-Harris, J.E.
"A new culture medium of the isolation of Bacillus typhosus from stools"
J. infect. dis. 18; 596-600; (1916).

12. Jawetz, Ernest.
"Manual de Microbiología Médica".
16ª Edición, El Manual Moderno, S.A. (1989).
13. Kallings, L.O., Rigertz O.
"Microbiological contamination of Medical Preparations"
Acta Pharm. Suecica Vol. 3, (1966).
14. Law Mess and Lashen.
"Cosmetics and Drug Preservation. principles and Practice".
John J. Kabara, New York and Basel.
15. Lennington, K.R.
"Regulatory control of microbiological contamination of non-sterile pharmaceuticals and cosmetics in the U.S.A. "
In Joint Symposium of Microbiological Control, Oxford, Blackwell, 1971.
16. Lorenz, Peter.
"5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano: A preservative for cosmetics".
Cosmetics and toiletries, Vol. 92, (89-91), March 1977.
17. Lynch, raphael, Mellor, Spare, Inwood.
"Métodos de laboratorio".
Editorial Interamericana (1989).
18. Mc. Carthy, T.J.
"Further studies on the influence of formulation on preservative activity".
Cosmetics and Toiletries, Vol. 92, (79-86), March 1977.
19. Pickett, M.J.
"New methodology for identification of nonfermenters: rapid methods"
Ed. Gilardi, G.L., W. Palm Beach, Fl. CRC Press (1978).
20. Richardson, E.L.
"Preservatives frequency of use in Cosmetic Formulas as disclosed to FDA"
Cosmetics and toiletries, Vol. 92 (79-86), March 1977.
21. Rippon, John W.
"Tratado de micología moderna".
Ed. Interamericana (2ª Edición).
22. Roberts, Goodmabn, Lead and Mc. Ginnins.
"Manual of clinical microbiology".
4th. Edition; ASM. Washington.

23. Rosen, W.E.
"Germall 115: A safe and effective modern cosmetic preservative".
Cosmetics and Toiletries, Vol. 92 (88-89), March 1977.
24. Schmitt, W.H; Williams D.F.
"Chemistry and Technology of the Cosmetics and toiletries Industry".
First Edition, Chapman & Hall (1992).
25. The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association Inc.
"Microbiological Sampling Guidelines for the Cosmetic Industry".
CTFA, 1983.
26. W.A. Poucher
"Perfumes, Cosmetics and Soaps. Modern cosmetics".
Eight Edition, Chapman & Hall (1974).
27. W.A. Poucher.
"Poucher's. Perfumes, Cosmetics and Soaps. The New Raw Materials of
Perfumery"
Ninth Edition, Chapman & Hall (1991).
28. W. Koneman, Elmer
"Diagnóstico microbiológico".
1ª Edición. Editorial Médica Panamericana (1991).
29. Wallhouser, K.H.
"The Problems of Preserving Cosmetics".
Cosmetics and Toiletries, Vol. 81, (45), Sept. 1976.
30. Woodward, C.R.
"Some microbiological Aspects of Cosmetic Manufacturing"
Am. Perf. and Cosm. , Agosto 1989.

31. Yablonski, John.

"Strategies for cosmetic preservation".

Cosmetics and toiletries, Vol. 92, (22-31), March 1977.

32. Douglas C. Montgomery.

"Diseño y análisis de experimentos".

Grupo Editorial Iberoamericano (1993).

33. J.O'Neill, and C. Mead.

"The parabens: bacterial adaptation and preservative capacity, presentation made to the Society of Cosmetic Chemists.

Washington, D.C.; 1981.