

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
SEDE VIÑA DEL MAR – JOSÉ MIGUEL CARRERA

DETERMINACIÓN DE EFICACIA DE EXTRACTOS DE LA *Taraxacum officinale*
(DIENTE DE LEÓN) EN PROBLEMAS CUTÁNEOS A TRAVÉS DE UN PRODUCTO
COSMÉTICO

Trabajo de Titulación para optar al Título
de Técnico Universitario en QUÍMICA
CON MENCIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA

Alumnos:

Stefanny Nicol Marchant Santis

Nicole Andrea Mejías Salinas

Profesor Guía:

Sra. María Elisa Escobar

Profesor Correferente:

Sr. Bernardo Prado Alderete

2015

RESUMEN

Keywords: *TARAXACUM OFFICINALE*, ACNÉ, PIEL, PRODUCTO COSMÉTICO.

Taraxacum officinale o diente de león es una planta medicinal que se ha distribuido por todo el mundo encontrándola como maleza o bien de manera silvestre a la orillas de camino, terrenos baldíos, jardines, etc.

Esta ha sido utilizada como medicina alternativa desde tiempos ancestrales ayudando a depurar el organismo de diferentes maneras, tales como insuficiencia y congestión hepatobiliar, también como preventivo de las litiasis biliares, digestiones lentas, estreñimiento, oliguria, reumatismos, obesidad, arteriosclerosis, enfermedades de la piel (tales como acné, eczemas, forunculosis, herpes), etc.

Debido a la escasa información e investigación que existente sobre la planta en casos de enfermedades de la piel en particular el acné, en el presente trabajo se realizó un estudio sobre la eficacia de *Taraxacum officinale*, formulando una crema en base a la planta.

Para la fabricación del extracto, primero se realizó la recolección de las plantas incluyendo hojas, raíz, tallos y flor. Luego se procedió a una etapa de limpieza y desinfección antes de empezar la extracción. Se utilizó aceite de oliva y propilenglicol/agua para obtener los extractos. El primer macerado se dejó en oscuridad durante 15 días y el segundo durante 5 días el cual fue puesto a ultrasonido durante 45 minutos todos los días del proceso.

Luego de esto se formuló la crema de textura ligera y no grasa adicionando otros componentes para mejorar sus propiedades tales como conservantes libres de parabenos, filtro de protección solar, esencia de aloe para mejorar su aroma, vitaminas, etc.

Para asegurar la estabilidad e inocuidad del producto se realizaron pruebas de estabilidad durante dos meses, en los cuales se analizaron sus características organolépticas, físico - químicas y microbiológicas. También se determinó pH, viscosidad, estabilidad térmica (40°C) y en centrifuga, hongos y levaduras, patógenos y aerobios mesófilos, siendo practicados al inicio y durante el primer y segundo mes desde iniciado los análisis.

También se realizaron pruebas de aplicación en modelos los cuales tenían problemas en la piel tales como manchas y acné, para así demostrar los efectos de las cremas formuladas. En Paralelo se formuló una crema sin extracto la cual también fue analizada y aplicada en modelos de pruebas, para así ver el efecto de los otros componentes de la formulación y sus efectos sin el extracto.

Para la prueba de aplicación se seleccionaron modelos que tenían acné o manchas en la piel y se le entregó a cada uno distintas formulaciones (F1, F2 o F3) para comprobar su efecto. Durante dos meses los modelos de prueba debieron aplicarse durante el día y la noche estas muestras, realizando un aseo en su rostro o parte afectada.

A través de registro fotográfico se ha podido demostrar la eficacia del extracto en problemas de acné, pero en menor medida se ha observado un efecto en manchas.

INDICE

RESUMEN

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

JUSTIFICACIÓN

ALCANCE

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTO TEÓRICO

- 1.1. PROBLEMAS CUTANEOS
 - 1.1.1. Enfermedades de la piel leves
 - 1.1.2. Enfermedades Infecciosas
 - 1.1.3. Afecciones cutáneas
 - 1.1.4. Problemas de Pigmentación
 - 1.1.5. Cáncer a la piel
- 1.2. ERUPCIONES
 - 1.2.1. Prevención
 - 1.2.2. Consecuencias y tratamiento
- 1.3. *TARAXACUM OFFICINALE* (DIENTE DE LEÓN)
 - 1.3.1. Taxonomía
 - 1.3.2. Morfología
 - 1.3.3. Propiedades biológicas
 - 1.3.4. Composición química
 - 1.3.5. Beneficios
- 1.4. PRODUCTO COSMÉTICO
 - 1.4.1. Crema
- 1.5. EXTRACTOS DE DIENTE DE LEÓN
 - 1.5.1. Propilenglicol
 - 1.5.2. Aceite de oliva

CAPÍTULO 2: MÉTODOS ANALÍTICOS

- 2.1. EXTRACCIÓN
 - 2.1.1. Maceración en plantas
- 2.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS
 - 2.2.1. Aerobios mesófilos
 - 2.2.2. Hongos y levaduras
 - 2.2.3. *Staphylococcus aureus*
 - 2.2.4. *Salmonella spp*
 - 2.2.5. *Escherichia coli*
 - 2.2.6. *Pseudomona aeuroginosa*
 - 2.2.7. Tinción de Gram
 - 2.2.8. Pruebas bioquímicas

- 2.3. ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICOS
- 2.3.1. Potencial de hidrógeno
- 2.3.2. Viscosidad
- 2.3.3. Prueba de estabilidad acelerada

CAPÍTULO 3: DISEÑO EXPERIMENTAL

- 3.1 PROCEDIMIENTO DE ELABORACIÓN DE CREMA
- 3.1.1. Elaboración de crema
- 3.2. PROCEDIMIENTOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS
- 3.2.1. Preparación y control de medios de cultivo y soluciones
- 3.2.2. Recuento total de aerobios mesófilos
- 3.2.3. Recuento de hongos y levaduras
- 3.2.4. Investigación de *Staphylococcus aureus*
- 3.2.5. Detección de coliformes e identificación de *Escherichia coli*
- 3.2.6. Investigación de *Pseudomona aeuroginosa*
- 3.2.7. Investigación de *Salmonella spp.*
- 3.3. PROCEDIMIENTOS ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICOS
- 3.3.1. Determinación de características organolépticas
- 3.3.2. Determinación de pH
- 3.3.3. Determinación de viscosidad
- 3.3.4. Determinación de pruebas de estabilidad
- 3.4. ANÁLISIS DE DATOS
- 3.5. EXPRESIÓN DE RESULTADOS
- 3.5.1. Media aritmética

CAPÍTULO 4: DESARROLLO EXPERIMENTAL

- 4.1. PRUEBAS FISICO - QUÍMICAS
- 4.2. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS
- 4.3. CÁLCULOS
- 4.3.1. Resultados pH
- 4.3.2. Resultados viscosidad
- 4.4. RESULTADOS VISUALES

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXO A: EXTRACTO DEL DECRETO SUPREMO 239 DE 2002 DEL I.S.P.

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1-1. Componentes planta *Taraxacum officinale*
- Figura 1-2. Taxonomía diente de león
- Figura 1-3. Aceite de oliva extra virgen
- Figura 2-1. Escala en relación pH, pOH y concentración H⁺ y OH⁻
- Figura 3-1. Diagrama explicativo de elaboración de crema
- Figura 3-2. Muestras de cremas elaboradas
- Figura 3-3. Diagrama explicativo de recuento total aerobios mesófilos
- Figura 3-4. Diagrama explicativo de recuento de hongos y levaduras
- Figura 3-5. Diagrama explicativo de investigación *Staphylococcus aureus*
- Figura 3-6. Diagrama explicativo de detección de coliformes e identificación de *Escherichia coli*
- Figura 3-7. Diagrama explicativo de investigación de *Pseudomona aeuroginosa*
- Figura 3-8. Diagrama explicativo de investigación de *Salmonella spp*
- Figura 4-1. Modelo Nº1 de fórmula 2
- Figura 4-2. Modelo Nº2 de fórmula 2
- Figura 4-3. Modelo Nº3 de fórmula 2
- Figura 4-4. Modelo Nº4 de fórmula 2
- Figura 4-5. Modelo Nº1 de fórmula 1
- Figura 4-6. Modelo Nº 2 de fórmula 1
- Figura 4-7. Modelo Nº3 de fórmula 1
- Figura 4-8. Modelo Nº4 de fórmula 1
- Figura 4-9. Modelo Nº1 de fórmula 3
- Figura 4-10. Modelo Nº2 de fórmula 3
- Figura 4-11. Modelo que utilizó en lado izquierdo fórmula 1 y en lado derecho fórmula 2

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1-1. Composición química del diente de león contenida en 100 gramos
- Tabla 3-1. Preparación de medios a envasar en placa
- Tabla 3-2. Preparación de medios envasar en tubo
- Tabla 3-3. Preparación de medios a envasar en frasco
- Tabla 3-4. Interpretación de pruebas bioquímicas para identificación de *Escherichia coli*
- Tabla 3-5. Interpretación de pruebas bioquímicas para identificación de *Pseudomona aeuroginosa*
- Tabla 3-6. Interpretación de pruebas bioquímicas para identificación de *Salmonella spp*

- Tabla 4-1. Análisis físico - químicos realizados al inicio de las pruebas de estabilidad
- Tabla 4-2. Análisis físico - químicos realizados al primer mes transcurrido las pruebas de estabilidad
- Tabla 4-3. Análisis físico - químicos realizados al segundo mes transcurrido las pruebas de estabilidad
- Tabla 4-4. Análisis microbiológicos realizados a los extractos
- Tabla 4-5. Análisis microbiológicos realizados al inicio de las pruebas de estabilidad
- Tabla 4-6. Análisis microbiológicos realizados al primer mes transcurrido las pruebas de estabilidad
- Tabla 4-7. Análisis microbiológicos realizados al segundo mes transcurrido las pruebas de estabilidad
- Tabla 4-8. Valores de pH obtenidos
- Tabla 4-9. Valores de viscosidad obtenidos

SIGLAS Y SIMBOLOGÍAS

SIGLAS

I.S.P.	: Instituto de Salud Pública.
IMVIC	: Indol, Rojo de Metilo, Vogues Proskauer y Citrato.
LIA	: Agar Hierro Lisina.
MIO	: Agar Movilidad Indol Ornitina.
PCA	: Agar Plate Count.
pH	: Potencial de Hidrogeno.
ppm	: partes por millón.
spp	: Sin especificar especie.
TSI	: Agar Hierro Triple Azúcar.
u.f.c.	: Unidad formadora de colonias.
U.V.	: Radiación Ultra Violeta.
VRB	: Agar Rojo Bilis Violeta.
XLD	: Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato.

SIMBOLOGÍA

%	: Porcentaje.
°C	: Grados celsius.
cm	: Centímetro.
cps	: centipoise.
g	: Gramos.
ml	: mililitros.
N	: Normalidad.
seg.	: Segundos.
T	: Temperatura.

INTRODUCCIÓN

En el mercado actual existen distintos productos que se utilizan para la prevención, disminución o eliminación del acné, las cuales varían en componentes, valor y eficacia.

Las erupciones constituyen una de las principales manifestaciones del acné. Aparecen especialmente durante la pubertad y, además de considerarse antiestéticas, pueden producir una inflamación e infección importante en la piel.

Taraxacum officinale es una planta que tiene procedencia europea, la que actualmente se ha extendido por todos los continentes. Esta hierba ha sido utilizada desde la antigüedad por alquimistas y astrólogos, y en el siglo XVI se utilizaba para sanar el hígado por sus propiedades curativas.

Esta hierba actúa como depurativo corporal por los múltiples beneficios que entrega al cuerpo, siendo muy utilizada en comidas, infusiones, para consumo de está etc.

También una de las cualidades de esta planta es ayudar en el control del acné, utilizándose en forma de aceites o infusiones aplicadas tópicamente.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A través de un producto cosmético determinar la eficacia de los extractos de *Taraxacum officinale* debido a la poca investigación de la planta en problemas cutáneos.

HIPÓTESIS

A través de la elaboración de cremas comprobar la eficacia de los extractos de *Taraxacum officinale* en problemas cutáneos, tales como puntos negros, erupciones y manchas provocadas por el acné.

HIPÓTESIS DE NULIDAD (H_0)

- Las cremas que contienen los extractos no poseen efectos beneficiosos al cutis.

HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_1)

- Las cremas que contienen los extractos poseen efectos beneficiosos al cutis.

VARIABLES

- Dependiente: análisis microbiológicos, medición de pH, viscosidad y estabilidad.
- Independiente: el tiempo de análisis, temperaturas.

OBJETIVO GENERAL

- Formular y elaborar cremas a partir de extractos de *Taraxacum officinale* para ver su eficacia en problemas cutáneos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la eficacia de las cremas a lo largo del tiempo.
- Comparar los datos obtenidos entre las cremas.
- Utilizar parámetros estadísticos para obtener valores teóricos.

JUSTIFICACIÓN

Esta investigación se basa en la idea de formular cremas en base a extractos de *Taraxacum officinale*, ya que esta planta entrega múltiples beneficios tópicos. De esta planta solo se ha comprobado sus beneficios en infusiones utilizadas tópicamente, por esto la idea de estas cremas es ver si de esta forma los extractos mantienen sus propiedades benéficas a la piel, por lo que este producto nos entregaría una mayor facilidad de difusión entre las personas; además de garantizar la inocuidad basándose en las normas vigentes del ministerio de salud chileno.

ALCANCE

El presente trabajo está enfocado principalmente a laboratorios dedicados al área cosmetológica, personas con problemas cutáneos, etc.

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTO TEÓRICO

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1. PROBLEMAS CUTANEOS

Son afecciones de la piel. Existen problemas cutáneos comunes como alergias e infecciones que con un tratamiento médico básico pueden ser solucionados en poco tiempo.

1.1.1. Enfermedades de la piel leves

Dentro de los problemas cutáneos leves podemos encontrar alergias en la piel, dermatitis seborreica (incluyendo la caspa), dermatitis de contacto, infecciones en la piel causadas por hongos, virus y bacterias; acné, cicatrices, verrugas, picaduras y alopecia. La mayoría de estas lesiones son temporales y leves. Pueden controlarse en casa con algunos cuidados sencillos pero siempre es necesario el seguimiento de un médico o experto.

1.1.2. Enfermedades Infecciosas

Dentro de las enfermedades infecciosas encontramos sarampión, rubéola, varicela, escarlatina y meningitis. Usualmente estas enfermedades de la piel además de erupciones, presentan síntomas como fiebre y dolor de cabeza.

1.1.3. Afecciones cutáneas

Se encuentran algunas afecciones cutáneas como psoriasis, eczema atópico, urticaria, hipertrichosis y candidiasis. En la mayoría de los casos estas enfermedades de la piel requieren medicamentos más avanzados recetados por un médico, en especial cuando las molestias persisten durante mucho tiempo o se complican.

1.1.4. Problemas de Pigmentación

El grado de concentración de melanina en nuestro cuerpo determina la aparición de estos problemas. La melanina es el pigmento que proporciona color a la piel, ojos y pelo. Es producida por unas células denominadas melanocitos, producción en gran parte determinada por los genes.

La pigmentación de la piel también puede estar influenciada por factores como la exposición al sol, cambios hormonales, uso y contacto con medicamentos y químicos. Existen problemas de pigmentación como las manchas, pecas, cloasma, lentigos, marcas de nacimiento, vitíligo, lunares y verrugas. Estos problemas de la piel suelen ser difíciles de resolver.

No obstante, hay disponible una variedad de alternativas que van desde el encubrir con maquillaje hasta procedimientos con láser.

1.1.5. Cáncer a la piel

Algunas enfermedades de la piel serias y por ende de mayor cuidado incluyen los diferentes tipos de cáncer de piel incluyendo el melanoma maligno. Aunque no es un problema de la piel muy común, cada año se reportan más casos con este diagnóstico.

Se ha encontrado que una de las principales causas del cáncer de piel está relacionada con los efectos nocivos provenientes de la exposición en exceso o directa al sol. Debido al deterioro de la capa de ozono, los rayos del sol hoy en día pasan con mayor fuerza e impacto dañino que en años anteriores.

Por esta razón es necesario tomar algunas precauciones para el cuidado de la piel. Esto hace necesario el uso diario de un protector o bloqueador solar.

1.2. **ERUPCIONES**

Las erupciones son puntos negros o blancos en la piel que se producen cuando se obstruye un folículo piloso-sebáceo.

Las principales causas de las espinillas son:

- Pubertad: por un aumento de hormonas, durante la pubertad se produce un incremento de la secreción de grasa con la finalidad de proteger y suavizar la piel. Los poros de la piel pueden ser obstruidos por esta grasa dando lugar a un pequeño punto blanco abultado (resultado de obturación que ejerce la grasa). Otras veces presentan un aspecto plano y ennegrecido (consecuencia de la acumulación de células muertas con abundante melanina).
- Factores genéticos: existe una predisposición hereditaria a sufrir esta alteración a aquellas personas cuyos antecedentes ya la sufrieron.
- Alimentación: no está demostrado pero se afirma, que la ingestión de alimentos grasosos, como las carnes animales, el chocolate, o los productos de bollería pueden producir o empeorar esta afección.

1.2.1. Prevención

Los principales métodos de prevención de las espinillas son:

- Se debe evitar la extracción de los puntos apretando los bultos con las uñas, lo cual agrava la lesión y puede producir infecciones.
- Nunca debe extraerse una espinilla manualmente.
- Una limpieza adecuada de la piel con jabones naturales, como los jabones ecológicos de hierbas, que no contienen químicos irritantes, puede ser la forma más adecuada de prevenir la formación de espinillas.
- Tomar el sol favorece la recuperación y hace que no sea tan fácil su aparición.

1.2.2. Consecuencias y tratamiento

Este tipo de manifestaciones desaparece con el paso de los años. En general no requieren tratamiento excepto cuando se infectan, en este caso pueden llegar a producir infecciones importantes que requieren un tratamiento con antibióticos.

El tratamiento natural de las espinillas supone la utilización de unos recursos naturales que sean capaces de remediarlas o prevenir su aparición.

1.3. **TARAXACUM OFFICINALE (DIENTE DE LEÓN)**

1.3.1. Taxonomía



Fuente: <http://remediosabuelita.blogspot.com/p/60.html>

Figura 1-1. Componentes planta *Taraxacum officinale*.

Reino:	<u><i>Plantae</i></u>
Orden:	<u><i>Asterales</i></u>
Familia:	<u><i>Asteraceae</i></u>
Género:	<u><i>Taraxacum</i></u> <u><i>Cass.</i></u>
Especie:	<i>T. officinale</i> (34)

Fuente: [http://www.euroresidentes.com/Alimentos/dientede leon.htm](http://www.euroresidentes.com/Alimentos/dientede_leon.htm).

Figura 1-2. Taxonomía diente de león

1.3.2. Morfología

Esta planta vivaz, anual y perenne con raíz primaria larga y roseta basal, no suele alcanzar más de 40-50 cm. Tiene hojas alternas lanceoladas con una nervadura central, sin peciolo diferenciado, pinnatipartidas con lóbulos en forma triangular de márgenes dentados y agudos, a veces presenta microvellosidades, pedúnculos de la inflorescencia huecos, que al romperse emana un jugo lechoso amargo. Flores hermafroditas de un color amarillo dorado que la hacen fácilmente identificable. Corola en lígulas terminada en cinco pequeños dientes, florece en primavera a hasta fines de verano.

Se encuentra fácilmente en los caminos, pastizales, prados, siembra directa, y sobre todo en jardines, tanto que es considerada *mala hierba* o "maleza", por los jardineros.

1.3.3. Propiedades biológicas

Las hojas del Diente de león producen un efecto diurético muy efectivo, pero tienen la ventaja de que no drenan el potasio del organismo, y por lo tanto son más seguros que los diuréticos comerciales.

Las hojas y raíces de esta planta poseen varias propiedades que la convierten en una gran utilidad terapéutica. Las hojas actúan como diurético aumentando el flujo de orina. Muchos diuréticos tienen la desventaja de que hacen disminuir los niveles de potasio en la sangre. Sin embargo, el diente de león contiene altos niveles de potasio por lo que no tiene este efecto.

Las raíces contienen dos sustancias llamadas inulina y levulina que ayudan a balancear el nivel de azúcar en la sangre. También contienen otras sustancias que estimulan la digestión, el flujo de bilis del hígado y la vesícula biliar y la producción de ácido clorhídrico en el estómago. Todo esto convierte al diente de león en una gran ayuda para los procesos digestivos y para desintoxicar el colon y el hígado.

Favorece el restablecimiento de las funciones hepatobiliares, y calma las manifestaciones dolorosas con ese origen, tales como la anglicolitis y la colelitiasis. También es adecuado como depurativo de la sangre y ayuda al control del acné.

Se le reconocen propiedades contra los altos niveles de colesterol, la ictericia, el estreñimiento y la obesidad.

1.3.4. Composición química

Los componentes principales responsables de la acción del diente de león en el hígado y en el aparato digestivo, son los principios amargos. En las hojas y la raíz se encuentra la taraxacina, estos componentes son lactonas de sesquiterpenos del tipo del eudesmanólido y del germacranólido y son únicos en el diente de león. Es también una fuente rica de vitaminas y de minerales.

Las hojas tienen un alto contenido de la vitamina A así como cantidades moderadas de vitamina D, C y B, hierro, silicio, magnesio, zinc, y manganeso.

Las hojas son una fuente rica del potasio, que es interesante puesto que las hojas se utilizan para su acción diurética. Esto puede hacer al diente de león un proveedor natural de potasio como diurético, aunque su acción diurética es probablemente diferente de productos farmacéuticos. [2]

Específicamente las raíces contienen:

- Lactonasesquiterpénicas: eudesmanólidos como glucósidos de taraxinacetina, dihidrotaraxinacetina, taraxacólido, tetrahidroridentina; germacranólidos.

Estos compuestos son amargos y tiene propiedades antiinflamatorias, efectos citotóxicos de aplicación anticancerígena y mejora de la constitución de los músculos lisos asociados a vasos sanguíneos. [1]

- Alcaloide: taraxina.

Tiene efectos diuréticos, pero en altas dosis puede producir gastroenteritis.

- Triterpenos: beta-amirina, taraxol, taraxerol, taraxasterol.

Los triterpenos pentacíclicos presentan propiedades anti-tumorales, modulan el metabolismo glucídico y lipídico, propiedades cardiovasculares, antiinflamatorias, anti-parasitarias, etc. [3]

- Esteroides: beta-sitosterol, estigmasterol.

La investigación ha indicado que estigmasterol puede ser útil en la prevención de ciertos cánceres, incluyendo el de ovario, de próstata, de mama, y cáncer de colon. Los estudios también han indicado que una dieta alta en fitoesteroles puede inhibir la absorción de colesterol y los niveles más bajos de colesterol en suero al competir por la absorción intestinal. También posee propiedades como un potente antioxidante, hipoglucemiante e inhibición de la tiroides.

- Ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico: ácidos clorogénico, chicórico, monocateictárico.

Estos compuestos tienen acción diurética, efectos inmunoestimulantes, propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas.

- Polisacáridos homogéneos: inulina (2-40%).

Este compuesto promueve el crecimiento de microorganismos benéficos para la salud por poseer una actividad prebiótica. Entre otras funciones destacadas también ayuda a reducir los niveles de colesterol e insulina en sangre así como también ayuda a mejorar la absorción de ciertos minerales como magnesio, fósforo y calcio. [5]

- Polisacáridos heterogéneos: mucílagos.

El mucílago es una fibra soluble que forma una especie de gel cuya principal virtud es atrapar el colesterol, evitando que éste pase por el torrente sanguíneo. También es útil para combatir el estreñimiento, regular los niveles de azúcar y ayuda a la eliminación de toxinas del cuerpo. [6]

- Carotenoides: luteína.

Este compuesto protege la piel de los rayos del sol y previene el envejecimiento prematuro. A su vez, su capacidad de impedir los efectos nocivos de la oxidación, hacen que este pigmento sea importante contra el cáncer de piel. [4]

- Sales minerales: sales potásicas (4.5%).

Estas poseen un efecto diurético en el organismo y en exteriores ejercen una defensa ante distintas plagas como hongos, algas, etc.

Las hojas contienen:

- Lactonas sesquiterpénicas.

- Flavonoides: glucósidos de apigenina, luteolina.

Los flavonoides tienen efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antiagregantes plaquetarias, bacterianas, etc.

- Hidroxicumarinas: cichorina, esculina.

Derivados de la cumarina que tienen efectos antitumorales, antiarrítmicos, antiinflamatorios, antisépticos, analgésicos, etc.

- Sales minerales: sales potásicas.

Tabla 1-1. Composición química del diente de león contenida en 100 gramos

Sustancias	Porcentaje
Calorías	45,0
Agua	87,50
Hidratos de carbono	7,00
Proteínas	2,70
Grasas	0,70
Sales	2,10

Fuente: http://www.hipernatural.com/es/pltdiente_de_leon.html.

1.3.5. Beneficios

- Aperitivo, digestivo y tónico estomacal.
- Colerético.
- Insuficiencia hepática, hepatitis y cirrosis: puede llegar a triplicar la producción de bilis, descongestionando así el hígado y facilitando su función de desintoxicación.
- Disquinesias biliares: vesícula perezosa y otros trastornos de su funcionamiento.
- Colelitiasis (cálculos en la vesícula biliar): el diente de león no es capaz de disolver los cálculos, pero permite un mejor funcionamiento de la vesícula a la espera de un tratamiento definitivo.
- Diurético y depurativo.
- Laxante suave.
- Control del acné.

1.4. **PRODUCTO COSMÉTICO**

Se define como producto cosmético cualquier preparado que se destine para ser aplicado externamente al cuerpo humano con fines de embellecimiento, modificación de su aspecto físico o conservación de las condiciones físico químicas

normales de la piel y su anexos, comprendiendo en ellos las uñas, sistema piloso, membranas mucosas de la cavidad oral, dientes y órganos genitales externos.

1.4.1. Crema

En medicina o en farmacia, una crema es un preparado semisólido para el tratamiento tópico. Tiene una base de agua (a diferencia de un ungüento o pomada). Las cremas contienen de un 60 a 80% de agua, para poder formar un líquido espeso y homogéneo. Estos preparados suelen contener una fase lipófila y otra fase hidrófila.

1.4.1.1. Componentes de elaboración de la crema

- Glicerina USP: humectante y suavizante de la piel utilizado en lociones y cremas corporales.
- Novemer EC-1: estabiliza emulsiones que contienen niveles altos de electrolitos y mejora la sensación en la piel entregando suavidad a ésta.
- Silsense DW-18: acondicionador, emulsificante y emoliente que está destinada a combatir la sequedad en la piel.
- Acrylates/C10-30AI (carbopolutrez 20): producto versátil que se puede usar cuando sus formulaciones requieren viscosidad y propiedades de suspensión. Se desempeña de manera efectiva en un amplio rango de pH.
- Trietanolamina 99%: base débil utilizada como ajustador de pH en aplicaciones cosméticas como lociones corporales, geles y cremas.
- Glyceryl ST/Peg-100 (arlacel 165): emulsionante para cremas y lociones ricas en aceite y ceras no polares.
- Vitamina E: antioxidante que ayuda al cuerpo a combatir los radicales libres presentes en el medio ambiente.
- Aceite mineral: producto que forma una película fina que aísla la piel del aire manteniéndola así más suave e hidratada.
- Nylon 12 (nylon power SP 500): producto que absorbe las secreciones de la piel que entrega suavidad y un aspecto sin brillo.
- Kathon CG: conservante utilizado en el área cosmética.
- Extracto raíz imperata: reafirmante que prolonga el tiempo de humectación en la piel.

- Silicona THV 148: producto que ayuda a suavizar y proteger del frío.
- Octilmetoxicinamato: producto que entrega protección a los rayos UV.
- Perfume silk aloe: producto que ayuda a enmascarar los aromas de las grasas.
- Extracto diente de león: principio activo.

1.5. EXTRACTOS DE DIENTE DE LEÓN

Se utilizó dos compuestos para las extracciones hechas en la planta:

- Propilenglicol.
- Aceite de oliva.

1.5.1. Propilenglicol

El propilenglicol (nombre sistemático: propano-1,2-diol) es un compuesto orgánico incoloro, insípido e inodoro. Es un líquido aceitoso claro, higroscópico y miscible con agua, acetona, y cloroformo. Se obtiene por hidratación del óxido de propileno. [9]

1.5.1.1. Propiedades

Se utiliza como estabilizante para mantener las cosas unidas, hidratadas y evitar que se evaporen.

1.5.1.2. Usos

- Agrega sabor en alimentos y bebidas.

- Estabiliza espumas en productos cosméticos y de salud.
- Ayuda a retener la humedad y el sabor de los alimentos de animales.
- Actúa como portador de ingredientes activos en vacunas, jarabes para la tos, cápsulas de gel, extractos, etc.
- Utilizado en variados productos cosméticos y de limpieza.
- Disolvente y portador de sabor o color en los procesos de fabricación de alimentos y bebidas.
- Espesante, clarificador y estabilizador en alimentos y bebidas tales como cerveza, aderezos de ensaladas o productos de panadería.

1.5.2. Aceite de oliva

Es un aceite vegetal de uso principalmente culinario que se extrae del fruto recién recolectado del olivo (*Olea europaea*) denominada oliva o aceituna.

1.5.2.1. Aceite de oliva extra virgen

Este tipo de aceite es de máxima calidad, se obtiene directamente de aceitunas en buen estado únicamente por procedimientos mecánicos, libre de defectos. No puede sobrepasar en su grado de acidez el 0,8 %, expresado en porcentaje de ácido oleico libre.



Fuente: www.lider.cl.

Figura 1-3. Aceite de oliva extra virgen

1.5.2.2. Composición

El 99% de su composición corresponde a diferentes ácidos grasos:

- ácido oleico entre 63 y 83%.
- ácido palmítico 7 a 17%.
- ácido esteárico entre 1.5 y 5%.
- ácido palmitoleico 0.3 a 3%.
- ácido linoleico 3 a 14%.
- ácido linolénico menos de 1.5%.

El 1% restante está formado por la vitamina E y antioxidantes naturales, entre los cuales se encuentran los polifenoles, pigmentos, aromas, etc.

La principal característica del aceite de oliva es el alto índice de ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico), y antioxidantes.

Tanto el ácido oleico (monoinsaturado) y el ácido linoleico (poliinsaturado) contenidos en el aceite de oliva, son fundamentales para la salud, ya que son necesarios, porque nuestro organismo no puede sintetizarlos. Estos ácidos grasos son conocidos como esenciales. [10]

1.5.2.3. Beneficios

- Previene la aparición de patologías cardiovasculares.
- Mejora el funcionamiento del aparato digestivo.
- Previene el estreñimiento cuando es tomado crudo y en ayunas.
- Tiene efecto protector y tónico sobre la piel.
- Mejora las funciones metabólicas y el desarrollo cerebral.
- Estimula la absorción de calcio.
- Reduce el desgaste de los tejidos por su poder antioxidante.

CAPÍTULO 2: MÉTODOS ANALÍTICOS

2. MÉTODOS ANALÍTICOS

2.1. EXTRACCIÓN

La extracción con disolventes es la técnica de separación de un compuesto a partir de una mezcla sólida o líquida, aprovechando las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla en un disolvente adecuado.

La separación de un compuesto por extracción se basa en la transferencia selectiva del compuesto desde una mezcla sólida o líquida con otros compuestos hacia una fase líquida (normalmente un disolvente orgánico). El éxito de la técnica depende básicamente de la diferencia de solubilidad en el disolvente de extracción entre el compuesto deseado y los otros compuestos presentes en la mezcla inicial.

El principal objetivo de la extracción es separar selectivamente el producto de una reacción, o bien eliminar las impurezas que lo acompañan en la mezcla de reacción, gracias a sus diferencias de solubilidad en el disolvente de extracción elegido. [16]

2.1.1. Maceración en plantas

La maceración es una forma de extraer las propiedades fitoterapéuticas de las plantas, usando como medio algún disolvente que se coloca en contacto con la planta. Los más comunes a utilizar son: aceites, alcohol, glicerina + agua, glicerina + alcohol, propilenglicol. Generalmente son de uso externo. El extracto resultante se puede utilizar para formular cremas, leches, ungüentos, permitiendo que los beneficios de las plantas penetren la superficie permeable de la piel.

Es necesario conocer las propiedades específicas de las plantas que se utilizan para hacer un uso adecuado del macerado obtenido. Como también es importante elegir bien el disolvente para sacar el máximo provecho de la planta.

Para las raíces, cortezas, hojas duras, ramas, los más indicados son el alcohol y el propilenglicol. Mientras que para las flores y hojas el aceite, la glicerina, son los más utilizados.

2.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Son análisis que ayudan a detectar y cuantificar diversos microorganismos en una muestra.

La importancia del control microbiológico tiene su fundamento en que los microorganismos y sus productos, especialmente los componentes de la pared celular, las enzimas y las toxinas, pueden causar infecciones en humanos y animales.

La capacidad de los microorganismos para crecer y reproducirse ha sido conocida durante muchos años. Los microorganismos pueden causar deterioro, cambios o daños para humanos animales y el ecosistema. Métodos para el aislamiento de microorganismos son los recuentos de colonias directos y cultivo de enriquecimiento. Identificación de patógenos, tinción de Gram, esterilidad, etc..

2.2.1. Aerobios mesófilos

Son todas aquellas bacterias aerobias o anaerobias facultativas, mesófilas o psicrófilas capaces de crecer en agar nutritivo. Se investigan por el método de recuento en placa con siembra en profundidad, que se basa en contar el número de colonias desarrolladas en una placa de medio de cultivo sólido (agar para recuento en placa o PCA), donde se ha sembrado un volumen conocido de la solución madre o sus diluciones (1 ml), incubadas a 37° C durante 24 horas.

Se deberán contar todas las colonias desarrolladas en cada placa. Los recuentos "totales" expresan el número por gr o ml de (u.f.c.), obtenido en determinadas condiciones de cultivo en medio sólido incubado.

Los resultados de este análisis permiten:

- Verificar efectividad de los procedimientos de limpieza y desinfección.
- Determinar si las temperaturas aplicadas en los procesos fueron las adecuadas.
- Determinar el origen de la contaminación durante los procesos de elaboración.
- Verificar condiciones óptimas de almacenamiento y transporte.
- Obtener información acerca de la vida útil.

El recuento en placa con siembra en profundidad es el método más utilizado para la determinación del número de células viables o unidades formadoras de colonias (u.f.c.) en un alimento, pero deben hacerse en función de uno de los siguientes factores:

- Método de muestreo utilizado.
- Distribución de los microorganismos en la muestra.

- Naturaleza del producto.
- Naturaleza de la microflora.
- PH.
- Antecedentes del producto.
- Adecuación nutricional del medio de cultivo.
- Temperatura y medio de incubación.
- Tipo de diluyente utilizado.
- Número relativo de microorganismos en la muestra.

Un recuento elevado puede significar:

- Excesiva contaminación de la materia prima.
- Deficiente manipulación durante el proceso de elaboración.
- La posibilidad de que existan patógenos, pues estos son mesófilos.
- La inmediata alteración del producto.

2.2.2. Hongos y levaduras

Se entiende por recuento de hongos y levaduras revivificables, el número de colonias que se desarrollan a partir de un gramo o mililitro de producto, sobre el medio Sabouraud dextrosa, durante 5 días entre 22-25°C.

Los hongos son organismos eucarióticos, cuya pared celular contiene quitina y β -glucanos. Son unicelulares o filamentosos, de reproducción sexual o asexual, saprófitos mutualistas o parásitos. En función de la temperatura de crecimiento se dividen en:

- Termófilos: 20 – 50°C (40 – 50°C).
- Termo latente: máximo 50°C, mínimo por debajo de 20°C.
- Mesófilos: 10 – 40°C (20 – 35°C).
- Psicrófilos: por debajo de 10°C (por debajo de 20°C).

Los hongos engloban los mohos y las levaduras. Los mohos son multicelulares filamentosos cuyo crecimiento se reconoce por su aspecto aterciopelado. Las levaduras crecen en agregados de células independientes, cuando crecen forman colonias características.

2.2.3. *Staphylococcus aureus*

Es un microorganismo de distribución en el medio ambiente muy amplia, se encuentra de forma natural en el hombre, los animales de granja, el polvo y diversos alimentos y otros productos en los que la contaminación se debe principalmente a los manipuladores.

El principal problema a nivel de la microbiología es que *S. aureus* puede producir una enterotoxina termoestable, y otras toxinas. Estas toxinas actúan sobre receptores intestinales cuyos estímulos alcanzan el centro del cerebro, por lo que deberían considerarse como neurotoxinas.

El mayor inconveniente de estas toxinas es su elevada resistencia a los tratamientos térmicos habituales, soportando tratamientos de 72°C/13 segundo, e incluso 100°C/30 minuto. Se inactivan a temperaturas de esterilización de 115°C, resisten la irradiación y las enzimas proteolíticas.

En la detección de éste patógeno se realiza una siembra en superficie en un medio de cultivo sólido, preparando dos series de placas, con una cantidad determinada de la muestra problema si es líquida o una cantidad determinada de la suspensión madre para otros productos. La incubación de las placas es a 35°C durante 24 – 48 horas. Cálculo del número de *Staphylococcus aureus* por mililitro o por gramo de muestra a partir del número de colonias características obtenidas en las placas escogidas a los niveles de dilución que dan un resultado significativo, y confirmadas mediante la prueba de la coagulasa.

2.2.4. *Salmonella spp*

El género *Salmonella spp* pertenece a la familia de las enterobacterias y constituye un grupo muy complejo de microorganismos patógenos para el hombre, pudiendo afectar a diversos animales.

Comprende dos especies:

- *Salmonella enterica*, dividida en seis subespecies.
- *Salmonella bongori*.

Todas ellas se pueden identificar por características fenotípicas fáciles de ver. El método de investigación de *Salmonella spp* es en cuatro etapas:

- Pre enriquecimiento en medio no selectivo: Siembra de la muestra en agua de peptona tamponada e incubación a 37°C (35°C) durante 16 – 20 horas.

- Enriquecimiento en medios selectivos líquidos: Con el cultivo del pre enriquecimiento siembre en verde malaquita con cloruro de magnesio e incubación a 42°C por 24 horas, y en caldo selenito cistina e incubación a 37°C por 24 horas y 24 horas suplementarias.
- Aislamiento e identificación: A partir de los cultivos anteriores se siembran dos medios sólidos, agar rojo fenol verde brillante y otro medio selectivo a elección tal como el agar Vogues Jhonson. Ambos se incuban a 37°C por 24 horas y si es necesario 48 horas.
- Confirmación: Resiembra de las presuntas colonias de *Salmonella spp* y confirmación en los medios de ensayos bioquímicos y serológicos apropiados.

2.2.5. Escherichia coli

Es un coliforme fecal. Los coliformes fecales son un grupo de microorganismos seleccionados por incubación de los inóculos procedentes de un caldo de enriquecimiento de coliformes a temperaturas superiores a las normales (44 +/-0,5°C) y son muy indicativos de una posible contaminación de origen fecal. Se definen por la producción de ácido y de gas en caldo EC a 44 – 46°C (44,5 – 45,5°C). Las cepas enterohemorrágicas de *E. coli* no crecen a 44,5°C en la formulación convencional de EC, pero lo hacen cuando el porcentaje de sales biliares se reduce del 0,15 al 0,112%. Sólo unas pocas cepas son patógenos verdaderos, enteropatógenos; o patógenos oportunistas. Es muy resistente en suelo y agua. Muere a 60°C en 15 minutos, y con 0,5 ppm de cloro.

Vive en el tracto intestinal del hombre y animales, por eso su presencia indica contaminación directa o indirecta de origen fecal.

Para la detección de éste patógeno se realiza una siembra con el medio agar V.R.B., en una placa de Petri con una cantidad determinada de la muestra problema si es líquida o una cantidad determinada de la suspensión madre para otros productos. En las mismas condiciones, siembra de diluciones decimales obtenidas de la muestra o de la suspensión madre. Incubación de las placas a 37°C durante 18 – 24 horas. Cálculo del número de *Escherichia coli* por mililitro o por gramo de muestra a partir del número de colonias características obtenidas en las placas de Petri.

2.2.6. Pseudomona aeuroginosa

Pertenece a la familia Pseudomonadaceae y es un bacilo gran negativo aerobio con un flagelo polar. Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Muchas cepas producen también el pigmento verde fluorescente pioverdina. *Pseudomonas aeuroginosa*, al igual que otras pseudomonas fluorescentes, produce catalasa y oxidasa, así como amoníaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono.

Éste patógeno puede causar diversos tipos de infecciones pero rara vez causa enfermedades graves en personas sanas sin algún factor predisponente. Coloniza predominantemente partes dañadas del organismo, como quemaduras y heridas quirúrgicas, el aparato respiratorio de personas con enfermedades subyacentes o las lesiones físicas en los ojos. Desde estos lugares puede invadir el organismo y causar lesiones destructivas o septicemia y meningitis. Muchas cepas son resistentes a diversos antibióticos, lo que puede aumentar su relevancia en el ámbito hospitalario.

En la detección de éste microorganismo se realiza una siembra en profundidad con el medio agar cetrimide, en una placa de Petri con una cantidad determinada de la muestra problema si es líquida o una cantidad determinada de la suspensión madre para otros productos. En las mismas condiciones, siembra de diluciones decimales obtenidas de la muestra o de la suspensión madre. Incubación de las placas a 37°C durante 48 horas. Cálculo del número de *Pseudomona aeruginosa* por mililitro o por gramo de muestra a partir del número de colonias características obtenidas en las placas de petri.

2.2.7. Tinción de Gram

Esta tinción se denominada así por el bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844 y nos ayuda a diferenciar bacterias Gram positivas de Gram negativas. Se denominan así por su morfología.

- Gram positivas: posee una capa externa compuesta por peptidoglicano.
- Gram negativa: posee una bicapa externa. La primera compuesta por peptidoglicano y la segunda de lipopolisacáridos y proteínas. [25]

2.2.8. Pruebas bioquímicas

Determinan la actividad metabólica de una cepa pura. Son empleadas principalmente en la identificación y clasificación de bacterias y hongos. [17]

2.2.8.1. Pruebas IMVIC

Son cuatro pruebas bioquímicas. Se emplean fundamentalmente para la identificación de las enterobacterias (bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos con metabolismo fermentador).

- Prueba de Indol: es un ensayo cualitativo utilizado para diferenciar microorganismos en base a la capacidad para separar indol a partir de L - triptófano. Es necesario el crecimiento previo del microorganismo en estudio en medios de cultivo con alto contenido de L - triptófano.
- Rojo de Metilo: estudia la fermentación ácido mixto con producción de ácidos estables en el tiempo.
- Voges Proskauer: estudia la fermentación butanodiólica con formación de un metabolito intermediario neutro.
- Citrato de Simmons: estudia la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono.

2.2.8.2. Pruebas enzimáticas

Pruebas que se basan en las reacciones enzimáticas que realizan algunos microorganismos.

- Agar hierro lisina (LIA): medio de cultivo utilizado para diferenciar microorganismos, especialmente *Salmonella spp.*, basado en la descarboxilación/desaminación de la lisina y en la producción de ácido sulfhídrico.
- Agar triple azúcar hierro (TSI): medio universalmente empleado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico.
- Agar movilidad indolornitina (MIO): medio usado para la identificación de enterobacteriaceae en base a su movilidad, actividad de ornitinadecarboxilasa y producción de indol.
- Test de coagulasa: estudia la producción de la enzima coagulasa, capaz de coagular el plasma. Diferencia *Staphylococcus aureus* de otras especies.
- Agar DNAsa: medio de cultivo utilizado para la detección de enzimas desoxirribonucleasas. Es especialmente útil para la diferenciación entre

especies de estafilococos, así como para la diferenciación de *Serratia* spp. de especies de *Klebsiella* y *Enterobacter*. [21]

- Test de oxidasa: estudia la presencia de la enzima citocromo c oxidasa que actúa en la cadena respiratoria del organismo.

2.3. **ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICOS**

Un análisis químico es el conjunto de técnicas y procedimientos empleados en muchos campos de la ciencia para identificar y cuantificar la composición química de una sustancia mediante diferentes métodos: [21]

- Químicos o clásicos: se basan en reacciones químicas, como el análisis volumétrico y el análisis gravimétrico.
- Fisicoquímicos o instrumentales: se basan en interacciones físicas como los métodos espectrométricos, electro analíticos o cromatográficos.

2.3.1. Potencial de hidrógeno

Se define al potencial hidrógeno (pH) como el logaritmo negativo de la concentración molar de los iones hidrógeno. [11]

$$\text{pH} = - \log [\text{H}^+]$$



Fuente: <http://www.investigacion.frc.utn.edu.ar/sensores/PH/pH.htm>.

Figura 2-1. Escala en relación pH, pOH y concentración H⁺ y OH⁻

2.3.1.1. PHmetro

Es un potenciómetro que mide la concentración de iones [H⁺], utilizando un electrodo sensible a los iones. En condiciones ideales dicho electrodo debería responder ante la presencia de un único tipo de ión, pero en la realidad se presentan interacciones o interferencias con iones de otras clases presentes en la solución.

Un electrodo de pH es generalmente un electrodo combinado, en el cual se encuentran integrados un electrodo de referencia y un electrodo de vidrio, en una misma sonda. La parte inferior de la sonda termina en un bulbo redondo de vidrio delgado. El tubo interior contiene cloruro de potasio saturado (KCl), invariable y una solución 0,1 M de ácido clorhídrico (HCl). También, dentro del tubo interior, está el extremo del cátodo del electrodo de referencia. El extremo anódico se envuelve así mismo en el exterior del tubo interno y termina con el mismo tipo de electrodo de referencia como el del tubo interno. Ambos tubos, el interior y el exterior, contienen una solución de referencia, pero únicamente el tubo exterior tiene contacto con la solución del lado externo del electrodo de pH, a través de un tapón poroso que actúa como un puente salino. Dicho dispositivo se comporta como una celda galvánica.

El electrodo de referencia es el tubo interno de la sonda analizadora de pH, el cual no puede perder iones por interacción con el ambiente que lo rodea, pues como referencia debe permanecer estático e invariable durante la realización de la medida.

El tubo exterior de la sonda contiene el medio al que se le permite mezclarse con el ambiente externo. Como resultado de lo anterior, este tubo debe ser llenado periódicamente con una solución de cloruro de potasio (KCl) para reponer la capacidad del electrodo que se inhibe por pérdida de iones y por evaporación.

El bulbo de vidrio en la parte inferior del electrodo de pH que actúa como elemento de medición está recubierto, tanto en el exterior como en el interior, con una capa de gel hidratado. Los cationes metálicos [Na+] se difunden en el gel hidratado fuera del vidrio y dentro de la solución, mientras que los iones [H+] de la solución se difunden dentro del gel hidratado.

El gel hidratado es el que hace que el electrodo de pH sea un electrodo selectivo de iones. El ión [H+] no cruza a través de la membrana de vidrio del electrodo de pH, es el ión sodio [Na+] el que cruza y permite un cambio de la energía libre. Cuando un ión se difunde de una región de actividad a otra, se presenta un cambio en la energía libre y esto es lo que mide el analizador de pH. [12]

2.3.2. Viscosidad

La viscosidad es una medida de la resistencia a fluir. La fuerza por unidad de área que se requiere para el movimiento de un fluido se define como F/A y se denota como " σ " (tensión o esfuerzo de cizalla). Según Newton la tensión de cizalla o esfuerzo cortante es proporcional al gradiente de velocidad (du/dy), o también denominado como D . Si se duplica la fuerza, se duplica el gradiente de velocidad:

$$\tau = \mu^*(du/dy) = \mu * D$$

Esta fórmula se denomina Ley de Newton, que es aplicable actualmente aún para unos fluidos determinados (Newtonianos). La glicerina y el agua son ejemplos muy comunes que obedecen la Ley de Newton. Para la glicerina, por ejemplo, la viscosidad vale 1000 mPa•s, en cambio para el agua la viscosidad vale 1 mPa•s, es decir, es mil veces menos viscosa que la glicerina.

La viscosidad se puede definir como una medida de la resistencia a la deformación del fluido, relaciona el esfuerzo cortante con la velocidad de deformación (gradiente de velocidad).

$$\tau = \mu * D \quad \tau = \mu * D$$

Dónde:

τ : esfuerzo cortante [mPa].

μ : Viscosidad [mPa•s].

D : velocidad de deformación [s-1].

Las unidades de viscosidad más utilizadas son los milipascales segundo [mPa•s]; 1000 mPa•s = 1 Pa•s. Además, el sistema cegesimal aún se sigue usando, siendo la unidad de medida el centiPoise [cP]; 1 cp = 1 mPa•s; La viscosidad " ν " denominada viscosidad cinemática, que relaciona la viscosidad dinámica con la densidad del fluido utilizado. Las unidades más utilizadas de esta viscosidad son los centistokes [cst]; 1 stoke = 100 centistokes = cm²/s.[13]

$$\nu = \mu/\rho$$

Siendo:

ν : Viscosidad cinemática.

μ : Viscosidad dinámica.

ρ : Densidad del fluido.

2.3.2.1. Viscosímetro

El viscosímetro es un Instrumento de medición y control de viscosidad, este equipo es indispensable en el control de calidad de múltiples productos.

Equipo que nos entrega la viscosidad de forma rápida y precisa. Automáticamente calcula y presenta, con solo apretar un botón, el parámetro necesario. Compatible con computadora para el procesado rápido de datos de viscosidad y posibilidad de tener una copia impresa conectándolo a un registrador, una impresora o computadora.

Además de sus características tradicionales, es programable por el usuario para el cálculo de las condiciones de contorno de cualquier husillo, puesta automática a cero y establecimiento automático de rango, mantiene la información en pantalla y en la salida, las condiciones por encima o debajo del rango. [14]

2.3.3. Prueba de estabilidad acelerada

También conocida como Estabilidad Normal o Exploratoria tiene como objetivo proporcionar datos para prever la estabilidad del producto, tiempo de vida útil y compatibilidad de la formulación con el material de acondicionamiento.

Esta prueba es empleada también en la fase de desarrollo del producto utilizándose lotes producidos en escala laboratorio y piloto de fabricación, pudiéndose extender a las primeras producciones. Emplea generalmente condiciones menos extremas que la prueba anterior. Sirve como auxiliar para la determinación de la estabilidad de la formulación. Es un estudio predictivo que puede ser empleado para

estimar el plazo de validez del producto. Además, puede ser realizado cuando existan cambios significativos en ingredientes del producto o del proceso de fabricación, en material de acondicionamiento que entra en contacto con el producto o para validar nuevos equipamientos o fabricación por terceros. [15]

2.3.3.1. Procedimiento de la prueba de estabilidad acelerada

Se recomienda que las muestras para evaluación de la estabilidad sean acondicionadas en frascos de vidrio neutro, transparente, con tapa que garantice un buen cierre, evitando pérdida de gases o vapor para el medio. La cantidad de producto debe ser suficiente para las evaluaciones necesarias. Si existiera incompatibilidad conocida entre los componentes de la formulación y el vidrio se debe seleccionar otro material de acondicionamiento.

Se debe evitar la incorporación de aire en el producto, durante el envasado en el recipiente de prueba. Es importante no completar el volumen total del recipiente permitiendo un espacio vacío de aproximadamente un tercio de la capacidad del frasco para posibles intercambios gaseosos.

Se puede utilizar, paralelamente al vidrio neutro, el material de acondicionamiento final; anticipándose de esta manera, la evaluación de la compatibilidad entre la formulación y el embalaje.

Generalmente tiene una duración de noventa días y las formulaciones en prueba son sometidas a condiciones menos extremas que en la prueba de estabilidad preliminar.

En algunos casos, la duración de esta prueba puede ser extendida por seis meses o hasta un año, dependiendo del tipo de producto. Las muestras pueden ser sometidas a calentamiento en estufas, enfriamiento en refrigeradores, exposición a la radiación luminosa y al ambiente.

Los valores generalmente adoptados para temperaturas elevadas son:

- Estufa: $T = 37 \pm 20^{\circ}\text{C}$.
- Estufa: $T = 40 \pm 20^{\circ}\text{C}$.
- Estufa: $T = 45 \pm 20^{\circ}\text{C}$.
- Estufa: $T = 50 \pm 20^{\circ}\text{C}$.

Los valores generalmente adoptados para bajas temperaturas pueden ser:

- Nevera: $T = 5 \pm 20^{\circ}\text{C}$.
- Congelador: $T = -5 \pm 20^{\circ}\text{C}$, $T = -10 \pm 20^{\circ}\text{C}$.

2.3.3.2. Exposición a la radiación luminosa

La radiación luminosa puede alterar significativamente el color y el olor del producto y llevar a la degradación de componentes de la formulación. Para la conducción del estudio, la fuente de iluminación puede ser la luz solar captada a través de vitrinas especiales para ese fin o focos que presenten espectro de emisión semejante al del sol, como los focos de xenón. También son utilizadas fuentes de luz ultravioleta.

Las muestras también deben ser sometidas a la prueba de estabilidad acelerada en su material de acondicionamiento.

Los productos deben ser almacenados en más de una condición de temperatura, para que se pueda evaluar su comportamiento en los diversos ambientes a los que pueda ser sometido.

La periodicidad de la evaluación de las muestras puede variar conforme la experiencia técnica, especificaciones del producto, características especiales de algún componente de la formulación o sistema conservante utilizado, sin embargo lo más usual en este estudio acelerado es que sean evaluadas inicialmente en tiempo cero, 24 horas y a los 7, 15, 30, 60 y 90 días. Si el estudio se prolonga por más tiempo, se recomiendan evaluaciones mensuales hasta su término.

Los parámetros a ser evaluados dependen de las características de la formulación en estudio y de los componentes utilizados en esta formulación. De manera general, se evalúan:

- Características organolépticas: aspecto, color, olor y sabor, cuando sea aplicable.
- Características físico-químicas: valor de pH, viscosidad y densidad, entre otros.
- Características microbiológicas: estudio del sistema conservante del producto por medio de la prueba de desafío efectuada antes y/o después del período de estudio acelerado.

Se debe tomar una muestra de referencia, también denominada patrón, que en general puede ser mantenida en nevera o a temperatura ambiente, al abrigo de la luz.

CAPÍTULO 3: DISEÑO EXPERIMENTAL

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

El objetivo de esta investigación es el de elaborar cremas a partir de un extracto de la planta *Taraxacum officinale*, para así poder determinar la eficacia de los extractos en un producto cosmético.

En esta investigación se obtuvieron dos extractos:

- En el primer extracto se realizó una maceración en aceite de oliva, en el cual la planta (hojas, raíz y flor) estuvo en contacto con este disolvente por dos semanas. Transcurrido este periodo se le realizó los análisis microbiológicos pertinentes.
- En el segundo extracto se realizó una maceración en propilenglicol/agua, estando en contacto con raíz, hojas y flor de la planta en observación. A este extracto se le forzó la extracción con baños de ultrasonido durante 40 minutos por cinco días. Transcurrido este periodo se le realizó los análisis microbiológicos pertinentes.

En la elaboración de las cremas con estos extractos se utilizaron diversos ingredientes que ayudan a la humectación, hidratación y protección solar. Estos no interfieren en las propiedades del extracto que se están observando en esta investigación.

Se elaboraron tres cremas en la cual dos contienen los extractos (un extracto por crema), y la tercera contiene todos los ingredientes excepto el extracto en observación (muestra control).

A todas las muestras elaboradas se les realizó análisis microbiológicos y químicos. Estos análisis son obligatorios para cualquier producto cosmético que se desee utilizar en seres humanos, siendo estos realizados antes de la entrega de las muestras a personas y después de terminadas las pruebas de estabilidad (dos meses).

3.1 PROCEDIMIENTO DE ELABORACIÓN DE CREMA

3.1.1. Elaboración de crema

3.1.1.1. Equipos

- Calefactor.

- Reactor.
- Balanza digital semi analítica 0,01 g Precisa, modelo XT 300.
- Agitador Silverson.

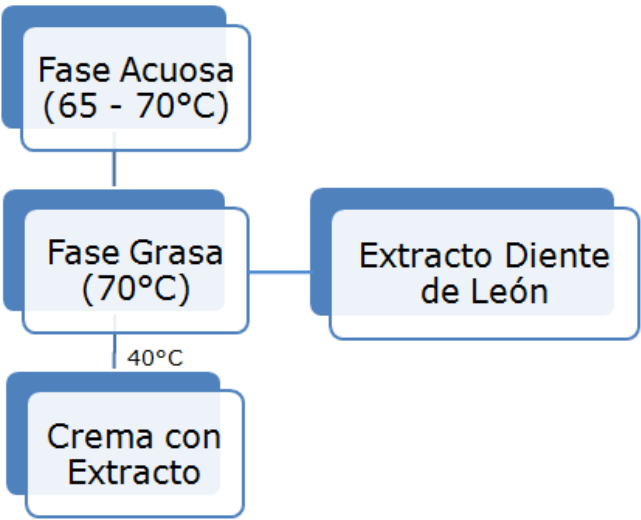
3.1.1.2. Materias primas

- Agua desionizada.
- Glicerina USP.
- Novemer EC-1.
- Silsense DW-18.
- Acrylates/C10-30AI (carbopolultrez 20).
- Trietanolamina 99%.
- Glyceryl ST/Peg-100 (arlacel 165).
- Vitamina E.
- Aceite mineral.
- Nylon 12 (nylon power SP 500).
- Kathon CG.
- Extracto raíz imperatacylindrica.
- Silicona THV 148.
- Extracto de diente de león.
- Octilmetoxicinamato.

3.1.1.3. Descripción de la actividad

- Usar guantes, mascarilla y gorro. Verificar cada uno de los pesos de las materias primas de la formula.

- Fase 1 acuosa: cargar en el reactor principal con el 100% del agua purificada calentar a 65 – 70°C. Agregar sobre esta acrylates/C10-30AI (carbopolultez 20) con agitación continua por un tiempo de 20 minutos, verificar que la solución esté libre de grumos. Continuar con glicerina USP, glyceryl ST/Peg-100 (arlacel 165), nylon 12 (nylon power SP 500) y aceite mineral, por 20 minutos con agitación rotor o mixer y paletas siempre con temperatura constante.
- Fase 2 emulsión: sobre fase 1 acuosa agregar con agitación paletas mas rotor o mixer novemer EC-1, silsense DW-18, homogeneizar. Continuar con trietanolamina 99% por 20 minutos siempre con temperatura de 65 – 70°C, verificar formación de emulsión, luego comenzar a enfriar con agitación de paletas. Una vez que la emulsión ha llegado a una temperatura de 40°C se agrega sobre esta extracto raíz imperata, perfume silk aloe, kathon CG, silicona THV, octilmetoxicinamato, extracto de diente de león, vitamina E, agitar por 15 minutos hasta homogeneizar completamente.



Fuente: Elaboración propia en base a procedimiento de elaboración del producto

Figura 3-1. Diagrama explicativo de elaboración de crema



Fuente: Elaboración propia en base a fotografía tomada en terreno

Figura 3-2. Muestras de cremas elaboradas

3.2. PROCEDIMIENTOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

3.2.1. Preparación y control de medios de cultivo y soluciones

3.2.1.1. Equipos

- Balanza digital semi analítica 0,01 g Precisa, modelo XT 300.
- Autoclave Labtech, modelo Lac-50605.

3.2.1.2. Materiales

- Frasco tapa rosca 100 mL.
- Frasco tapa rosca 250 mL.
- Frasco tapa rosca 500 mL.
- Frasco tapa rosca 1000 mL.
- Probeta de 100 mL.
- Probeta 250 mL.
- Probeta de 500 mL.
- Vaso precipitado 150 mL.

- Vaso precipitado 500 mL.
- Matraz aforado de 500 mL.
- Tubos de ensayo.
- Pipetas 5 mL.
- Pipeta 10 mL.
- Varilla de vidrio.
- Pro-pipeta.
- Espátula.
- Papel absorbente desechable.
- Cinta indicadora de esterilización para calor húmedo.

3.2.1.3. Reactivos

- Alcohol etílico al 70%.
- Caldo tripticasa de soya.
- Caldo RM-VP.
- Caldo selenito cistina.
- Caldo infusión cerebro corazón.
- Agua peptonada tamponada.
- Caldo de triptona.
- Agar tripticasa de soya.
- Agar Sabouraud dextrosa.
- Agar baird Parker.
- Agar cetrimide.

- Agar mac-conkey.
- Agar DNAsa.
- Agar citrato de Simmons.
- Agar XLD.
- Agar TSI.
- Agar MIO.
- Agar LIA.
- Agua destilada.
- Hidróxido de potasio (KOH).
- Tiosulfato de sodio.
- Alfa naftol, ácido acético.
- Rojo metilo.
- Etanol 95°.
- Glicerina.
- Tween 80.
- Emulsión de yema de huevo con telurito.

3.2.1.4. Descripción de la actividad

- Todos los frascos con medio de cultivos deshidratado, traen impresos las cantidades para la preparación adecuada de estos, si se requiere preparar distintas cantidades a las establecidas, use una regla de tres simple para calcular las cantidades necesarias.
- Todos los medios de cultivo se reconstituyen con agua destilada.

- Cuando se deba traspasar el medio desde el frasco a placa o a tubo, esto se debe realizar en la campana de flujo laminar teniendo siempre la precaución de mantener la esterilidad del medio.

3.2.1.5. Preparación medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se preparan en frascos preferentemente (envase intermedio) para luego ser esterilizados por calor húmedo, terminado el proceso de esterilización estos medios pueden ser traspasados a placas estériles, a tubos estériles o bien permanecer en el frasco, dependiendo del método de siembra, para luego ser almacenados en bolsas en el refrigerador, con su respectiva etiqueta, en las siguientes tablas se detalla la preparación y el envase final de estos.

Tabla 3-1. Preparación de medios a envasar en placa

Medio de cultivo	Cantidad de medio/volumen final agua destilada (g/100mL)	Tiempo de esterilización (autoclave)	Envase final para siembra
Agar tripticasa soya	4,0	15 minutos	Después de autoclavar. Distribuir en placas +- 20 mL.
Agar Sabouraud dextrosa.	6,5	15 minutos	Después de autoclavar. Distribuir en placas +- 20 mL.
Agar mac-conkey	5,15	15 minutos	Después de autoclavar. Distribuir en placas +- 20 mL.
Agar cetrimide	4,53 (+ 1 mL glicerina)	15 minutos	Después de autoclavar. Distribuir en placas +- 20 mL.
Agar baird Parker	6,3	15 minutos	Después de autoclavar. Adicionar 5 mL de emulsión de yema de huevo con telurito, agitar y distribuir en placas +- 20 mL.
Agar XLD	5,3	15 minutos	Después de autoclavar. Distribuir en placas +- 20 mL.
Agar citrato de Simmons	2,25	15 minutos	Después de autoclavar agregar 5 mL a cada tubo y solidificar extendiendo con un pequeño ángulo.
Agar DNAsa	3,9	15 minutos	Después de autoclavar. Distribuir en placas +- 20 mL.

Fuente: Elaboración propia en base a medios de cultivo

Tabla 3-2. Preparación de medios envasar en tubo

Medio de cultivo	Cantidad de medio/volumen final agua destilada (g/100mL)	Tiempo de esterilización (autoclave)	Envase final para siembra
Agar TSI	6,5	15 minutos	Después de autoclavar, agregar 5 mL a cada tubo, tapar. Enfriar extendiendo los tubos 2/3 de fondo por 1/3 de inclinación.
Agar MIO	3,1	15 minutos	Después de autoclavar, agregar 5 mL a cada tubo. Enfriar los tubos en posición vertical.
Agar LIA	3,2	15 minutos	Después de autoclavar, agregar 5 mL a cada tubo, dejar enfriar extendiendo los tubos 2/3 de fondo por 1/3 de inclinación.
Caldo RM-VP	1,7	15 minutos	Distribuir 5 mL en tubo y autoclavar.
Caldo tristona	1,5	15 minutos	Agregar 5 mL en tubo y autoclavar
Caldo infusión cerebro corazón	3,7	15 minutos	Agregar 5 mL en tubo y autoclavar
Caldo selenito cistina	2,3	Filtrar (no autoclavar)	Distribuir 10 mL en tubo estéril.

Fuente: Elaboración propia en base a medios de cultivo

Tabla 3-3. Preparación de medios a envasar en frasco

Medio de cultivo	Cantidad de medio/volumen final agua destilada (g/100mL)	Tiempo de esterilización (autoclave)	Envase final para siembra
Caldo tripticasa soya con Tween 80	3,0	15 minutos	Agregar 100 mL a cada frasco + 12,5 g de Tween 80 y autoclavar.
Caldo tripticasa soya	3,0	15 minutos	Agregar 100 mL a cada frasco y autoclavar.
Agua peptonada tamponada con Tween 80	2,0	15 minutos	Agregar 100 mL a cada frasco + 12,5 g de Tween 80 y autoclavar.
Agua peptonada tamponada	2,0	15 minutos	Agregar 100 mL a cada frasco y autoclavar.

Fuente: Elaboración propia en base a medios de cultivo

3.2.1.6. Preparación de reactivos

- Solución de hidróxido de potasio: colocar sobre la balanza un vaso precipitado y con espátula pesar 40 g de KOH. Transferir a un frasco tapa rosca de 100 mL; con probeta, medir 100 mL de agua destilada, agregar al frasco, tapar y agitar hasta disolución total. Llenar etiqueta y almacenar a temperatura ambiente.
- Solución de alfa naftol: colocar sobre la balanza un vaso precipitado y con espátula pesar 0,5 g de alfa naftol. Transferir a un vaso precipitado, luego con probeta medir 100 mL de ácido acético, agregar sobre el alfa naftol, agitar hasta disolución total. Transferir a un frasco con gotario ámbar, completar etiqueta y refrigerar.
- Indicador rojo metilo: colocar sobre balanza un vaso precipitado y con espátula pesar 0,10 g de rojo metilo. Transferir a un vaso precipitado de 500 mL. Con probeta, medir 300 mL de etanol 95°, agregar al vaso sobre el rojo metilo y agitar con varilla hasta disolución. Disuelto el rojo metilo, traspasar a un matraz aforado de 500 mL, con agua destilada arrastrar lo que queda

en las paredes del vaso y aforar a 500 mL. Completar etiqueta y almacenar a temperatura ambiente.

- Alcohol etílico al 70% (70°): a 100 mL de alcohol de 95°, agregar 39 mL de agua destilada. Mantener sellado; completar etiqueta y almacenar a temperatura ambiente.
- Solución de tiosulfato de sodio al 10%: colocar sobre balanza un vaso precipitado y con espátula pesar 10 g de tiosulfato de sodio. Transferir a un vaso precipitado y adicionar 100 mL de agua destilada medida con probeta. Agitar para disolver, cerrar y etiquetar.

3.2.2. Recuento total de aerobios mesófilos

3.2.2.1. Equipos

- Campana de flujo laminar.
- Estufa de cultivo.
- Baño termorregulador Amilab, modelo MTW12.
- Contador de colonias Quimis, modelo Q295B.
- Balanza digital Semi analítica 0,01 g Precisa, modelo XT 300.

3.2.2.2. Materiales

- Placas Petri estériles.
- Pipeta graduada 2 ml estéril.
- Envase plástico opaco.
- Papel absorbente desechable.

3.2.2.3. Reactivos

- Agar Tripticasa de Soya.
- Caldo Tripticasa de Soya.
- Alcohol Etílico 70%.

- Solución de Hipoclorito de Sodio al 0,5%.

3.2.2.4. Descripción de la actividad

- Preparar en envase plástico opaco solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Fluidificar el agar de los frascos y dejar en baño termorregulador a $48 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con el fin de que permanezca fluido.
- Dejar en esclusa de carga de materiales, todos los materiales estériles a utilizar.
- Dejar en esclusa de descarga de cultivos todas las placas y frascos inoculados.
- Dejar en esclusa de descarga de material todos los materiales utilizados.
- Durante todo el proceso el mechero debe permanecer encendido.
- Al entrar por la esclusa de cambio de vestuario se debe cambiar el delantal, colocarse los cubre calzado, toca, mascarilla, guantes e ingresar a la sala de siembra.
- Al salir por la esclusa de cambio de vestuario, cambiarse el delantal, sacarse los cubre calzado, toca, mascarilla y guantes, desechándolos y cruzando la esclusa de tránsito.

3.2.2.5. Siembra de muestra

- Encender el mechero, retirar de la esclusa de carga de materiales, muestras y frascos con caldo tripticasa de soya estéril.
- Depositarlos en el mesón de la campana de flujo laminar.
- Destapar un frasco de caldo tripticasa de soya, colocarlo sobre la balanza, tarar y pesar $5 \text{ ó } 10 \pm 0,5 \text{ g}$ según corresponda de muestra, flamear la boca y la tapa del frasco, cerrar, agitar y dejar al lado derecho del mesón.

Nota: este caldo inoculado con muestra se ocupa además para recuento de hongos y levaduras.

- Inoculados todos los frascos con su respectiva muestra, retirar la balanza.
- Retirar de la esclusa de carga de materiales pipetas y placas petri estériles, depositarlas en el mesón de la campana de flujo laminar, desenvolver las placas y rotularlas de acuerdo al rotulo del frasco con la muestra, tipo de análisis y fecha.
- Tomar el frasco de caldo tripticasa de soya conteniendo la muestra, agitarlo, abrir la tapa y flamear la boca del frasco con el mechero.
- Todas las muestras son sembradas en duplicado, para esto, con una pipeta estéril de 2 mL del caldo y verter 1 mL a una placa y 1 mL a la placa duplicado.
- Descartar la pipeta utilizada sumergiéndola en la solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Una vez inoculadas las placas, tomar un frasco de agar tripticasa de soya del baño termorregulador, rociar con alcohol etílico al 70% y secar con papel absorbente desechable, abrirla tapa del frasco, flamear la boca con el mechero y verter sobre la placa, directamente 20 +/- 5 mL.
- Mezclar el inóculo con el agar rotando las placas en círculo 3 veces en dirección a los punteros del reloj, luego 3 veces en sentido contrario y por último hacer movimientos en ocho 3 veces más.
- Dejar placas sembradas en esclusa de descarga de cultivos hasta solidificación.

3.2.2.6. Incubación

- Solidificado el agar, retirar las placas de la esclusa de descarga de cultivos, colocarlas en forma invertida en estufa de cultivo a 35 +/- 2°C por 48 horas.
- Los frascos con caldo tripticasa de soya inoculados, incubarlos en estufa de cultivo a 35 +/- 2°C por 24 horas como medio de enriquecimiento para continuar el estudio de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y estudio de *Pseudomonas aeruginosa*.

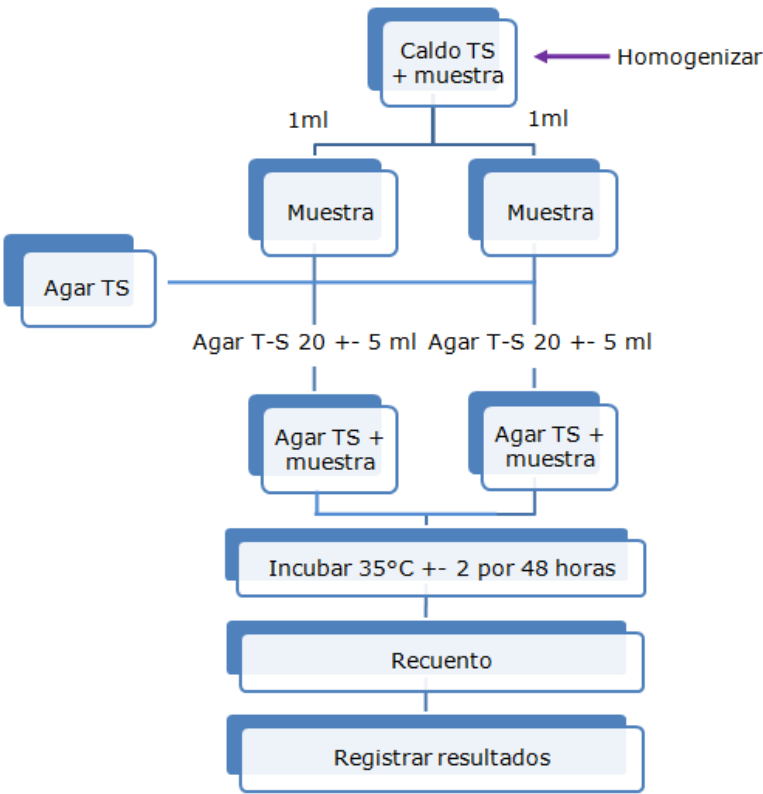
3.2.2.7. Recuento

- Transcurridas las 48 horas, retirar las placas de la estufa de cultivo y colocarlas en el mesón del área de recuento ordenadas con su duplicado.

- Conectar el contador de colonias, colocar cada placa bajo la lupa del contador y contar colonias si procede.

3.2.2.8. Expresión de resultados

- Si no se observa desarrollo bacteriano, el resultado se expresa < 10 u.f.c./g o < 10 u.f.c./mL (unidad formadora de colonias por gramo o mililitro).
- Si se observa desarrollo bacteriano, se realiza el conteo en la placa muestra y su duplicado, se promedian los valores y se multiplica por el factor de dilución (x10).
- Si la muestra presenta recuento o éste es dudoso, se repite el análisis.



Fuente: Elaboración propia en base al procedimiento de identificación de aerobios mesófilos

Figura 3-3. Diagrama explicativo de recuento total aerobios mesófilos

3.2.3. Recuento de hongos y levaduras

3.2.3.1. Equipos

- Campana de flujo laminar.
- Estufa de cultivo Memmert, modelo INB 500.
- Baño termostático Amilab, modelo MTW 12.
- Contador de colonias Quimis, modelo Q295B.

3.2.3.2. Materiales

- Placas de Petri estériles.
- Pipeta graduada de 2 ml estéril.
- Envase plástico opaco.
- Papel absorbente desechable.

3.2.3.3. Reactivos

- Agar Sabouraud Dextrosa estéril.
- Alcohol Etílico al 70%.
- Solución de Hipoclorito de Sodio al 0,5%.

3.2.3.4. Descripción de la actividad

- Preparar en envase plástico opaco solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Fluidificar el agar de los frascos y dejar en baño termostático a $48 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con el fin de que permanezca fluido.
- Dejar en esclusa de carga de material, todos los materiales estériles a utilizar.
- Dejar en esclusa de descarga de cultivos todas las placas y frascos inoculados.

- Dejar en esclusa de descarga de material todos los materiales utilizados.
- Al entrar por la esclusa de cambio de vestuario se debe cambiar el delantal, colocarse los cubres calzado, toca, mascarilla, guantes e ingresar a la sala de siembra.
- Al salir por la esclusa de cambio de vestuario, cambiarse el delantal, sacarse el cubre calzado, toca, mascarilla y guantes, desechándolos y cruzando la esclusa de tránsito.

3.2.3.5. Siembra de muestras

- Desenvolver las placas y rotularlas de acuerdo a la muestra, tipo de análisis y fecha.
- Tomar el frasco de caldo tripticasa de soya inoculado con la muestra anteriormente utilizada en "Recuento total de aerobios mesófilos", agitar, abrir la tapa y flamear la boca del frasco con el mechero.
- Con una pipeta de 2 mL estéril, tomar 2 mL del contenido y verter 1 mL a una placa y 1 mL a otra placa como duplicado.
- Descartar la pipeta utilizada sumergiéndola en la solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Inoculadas las placas, tomar el agar Sabouraud dextrosa del baño termorregulador, rociar con alcohol etílico al 70% y secar con papel absorbente desechable, abrir la tapa del frasco, flamear la boca con el mechero y verter directamente 20 +/- 5 mL en las placas inoculadas.
- Mezclar el inóculo con el agar rotando en círculo 3 veces las placas en dirección a los punteros del reloj. Luego 3 veces en sentido contrario por último hacer movimientos en ocho 3 veces más.

3.2.3.6. Incubación de las muestras

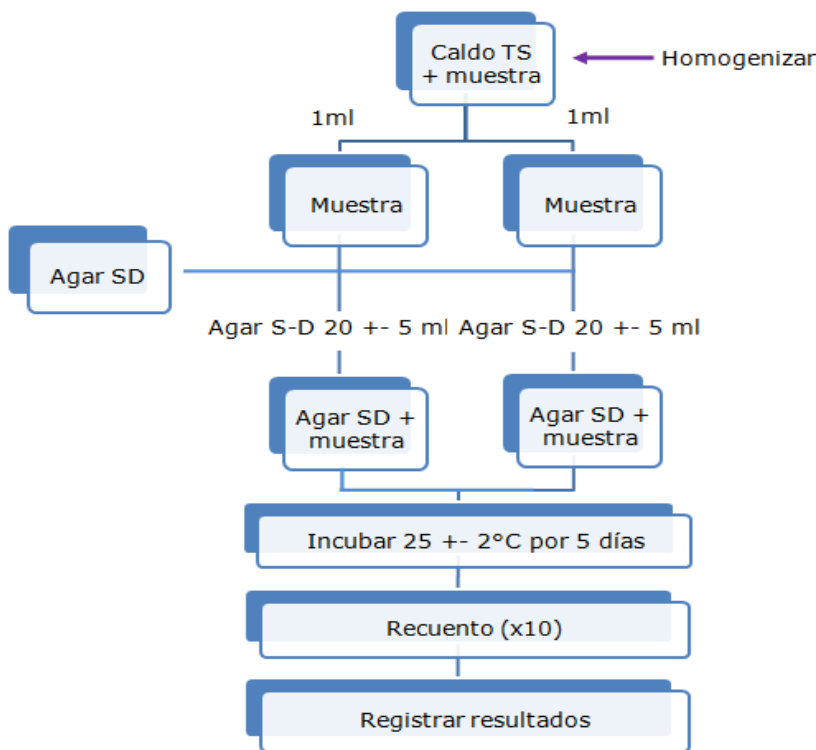
- Solidificado el agar de las placas, retirarlas de la esclusa de descarga de cultivos e incubar sin invertir en estufa de cultivo a 25 +/- 2°C por 120 horas (5 días).

3.2.3.7. Recuento de colonias

- Transcurrido los 5 días, retirar las placas de la estufa de cultivo y colocarlas en el mesón del área de recuento, ordenadas con su duplicado.
- Conectar el contador de colonias, colocar cada placa bajo la lupa y si hay desarrollo, contar las colonias.

3.2.3.8. Expresión de resultados

- Si no se observa desarrollo, el resultado se expresa: $< 10 \text{ u.f.c./g}$ o $< 10 \text{ u.f.c./mL}$ (unidad formadora de colonias por gramo o mililitro).
- Si se observa desarrollo de hongos que se presentan en forma filamentosa características (micelio) y de color variable, se cuentan por placa, se promedian y se multiplica por el factor de dilución ($\times 10$) y se registra.
- Si se observa desarrollo de levaduras que se presentan en forma de colonias cremosas, blancas o coloreadas, se cuentan por placa, se promedian los valores y se multiplican por el factor de dilución ($\times 10$) y se registra.



Fuente: Elaboración propia en base a procedimiento de identificación de hongos y levaduras

Figura 3-4. Diagrama explicativo de recuento de hongos y levaduras

3.2.4. Investigación de *Staphylococcus aureus*

3.2.4.1. Equipos

- Campana de flujo laminar.
- Estufa de cultivo Memmert, modelo INB 500.
- Refrigerador Sindelen, modelo Optimus 4200.
- Microscopio Quimis sin modelo.
- Timer.

3.2.4.2. Materiales

- Aceite de inmersión.
- Papel absorbente desechable.
- Asa de siembra.
- Pinza metálica.
- Portaobjetos.

3.2.4.3. Reactivos

- Set tinción Gram.
- Plasma de conejo citratado.
- Solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Agua destilada estéril.
- Alcohol etílico al 70%.
- HCl 1 N.
- Placa petri con agar baird Parker.
- Placa petri con agar DNAsa.
- Frascos de caldo tripticasa de soya con muestra enriquecida.

- Tubos de ensayo de caldo infusión cerebro corazón.

3.2.4.4. Descripción de la actividad

- Preparar en envase plástico opaco una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Durante todo el proceso el mechero debe permanecer encendido.
- Dejar en esclusa de carga de material, todos los materiales estériles a utilizar.
- Dejar en esclusa de descarga de material todos los materiales utilizados.
- Al entrar por la esclusa de cambio de vestuario se debe cambiar el delantal, colocarse los cubre calzado, toca, mascarilla, guantes e ingresar a la sala de siembra.
- Al salir por la esclusa de cambio de vestuario, cambiarse el delantal, sacarse el cubre calzado, toca, mascarilla y guantes, desechándolos y cruzando la esclusa de tránsito.
- Retirar muestras enriquecidas de caldo tripticasa de soya de la estufa de cultivo, sacar del refrigerador placas con agar baird Parker y dejar en esclusa de descarga de cultivos.

3.2.4.5. Siembra de muestras

- Encender el mechero y retirar de la esclusa de carga de materiales, el frasco de caldo tripticasa de soya inoculado con la muestra, y las placas con agar baird Parker, depositándolas en el mesón de la campana de flujo laminar. Rotular las placas en el frasco con muestras, fecha y análisis.
- Tomar un frasco, agitar, abrir y flamear la boca con el mechero, luego flamear el asa de siembra hasta enrojecer, enfriar y tomar un inóculo con el asa, extenderlo sobre la placa con agar en forma de zigzag.

- Finalizado el traspaso, dejar las placas en la esclusa de descarga de cultivos y los frascos en esclusa de descarga de materiales.

3.2.4.6. Incubación

- Retirar las placas de la esclusa de descarga de cultivos y colocarla en forma invertida en estufa a 35 $\pm$ 2°C por 48 horas.

3.2.4.7. Expresión de resultados

- Si no se observa desarrollo bacteriano en la placa en estudio, el resultado se expresa como negativo (ausencia de *Staphylococcus aureus*), dándose término al análisis.
- Si se observa desarrollo bacteriano, seguir las pruebas de confirmación, seleccionar las colonias de color negro o gris oscuro, de consistencia cremosa y que presenta una o más de las siguientes características:
 - Discreta zona de precipitado debajo de la colonia.
 - Una zona clara o halo alrededor de la colonia, con una zona de precipitado debajo de ella.
 - Una zona clara o halo alrededor de la colonia, sin precipitado.

3.2.4.8. Prueba de confirmación tinción Gram

- Sobre un portaobjeto colocar una gota de agua destilada estéril, con el asa picar una colona y suspenderla en el agua, fijar al mechero.
- Teñir el frotis con cristal violeta 1 minuto.
- Lavar cuidadosamente con abundante agua durante algunos segundos.
- Cubrir la preparación con lugol, mantener durante 1 minuto y lavar cuidadosamente con abundante agua.
- Decolorar varias veces con alcohol-acetona o alcohol etílico de 95° hasta que no se elimine colorante, posteriormente, lavar con agua corriente (30 seg.).

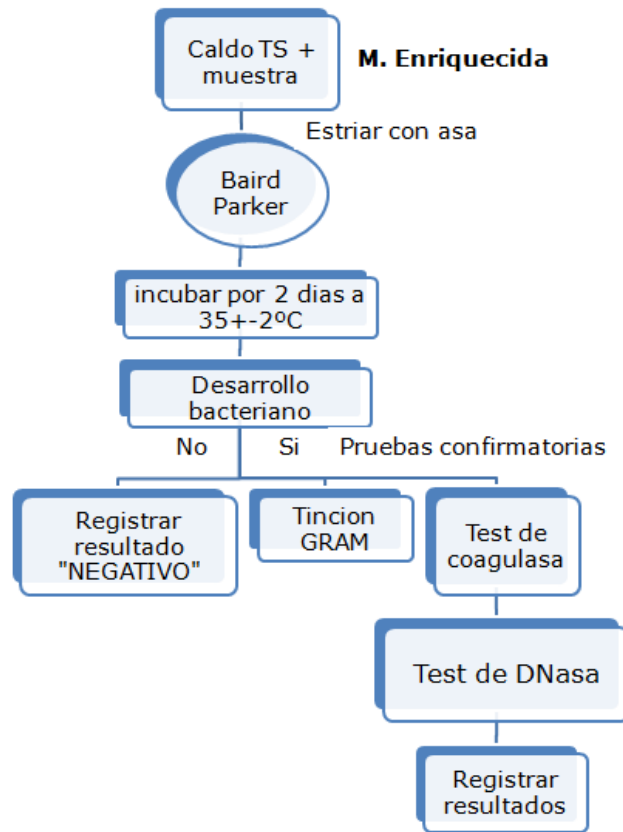
- Teñir con solución de safranina, durante 30 segundos y lavar con abundante agua.
- Secar la preparación.
- Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la zona teñida y observar al microscopio con aumento 100x.
- Se debe observar cocos en forma de racimos de color azul - violeta.
- Eliminar portaobjeto en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.

3.2.4.9. Prueba de confirmación Test de coagulasa

- Bajo campana de flujo laminar, tomar el asa de siembra, pasarla por el mechero hasta enrojecer y dejar enfriar, picar una colonia aislada de la placa en estudio y traspasar al tubo con 5 mL de caldo infusión cerebro corazón e incubar en estufa de cultivo a 35 +- 2°C por 24 horas.
- Cumplido el tiempo de incubación, bajo campana de flujo laminar, traspasar 0,3 mL del cultivo a un tubo con 0,5 mL de plasma de conejo citratado y llevarlos a incubar a 35 +- 2°C por 6 horas. Observar si hay formación de coagulo. Si no hay formación de coagulo dejar incubar hasta cumplir 24 horas.

3.2.4.10. Prueba de confirmación DNAsa

- Bajo campana de flujo laminar, tomar el asa de siembra, pasarla por el mechero hasta enrojecer y dejar enfriar, picar una colonia aislada de la placa en estudio y traspasar al tubo con 5 mL de caldo infusión cerebro corazón e incubar en estufa de cultivo a 35 +- 2°C por 24 horas.
- Del caldo infusión de cerebro corazón tomar un inculo y traspasar en forma de zigzag a la placa de DNAsa e incubar a 35 +- 2°C por 48 horas.
- Sobre la placa con desarrollo microbiano agregar 10 +- 2 mL HCl 1 N.
- Observar la formación de un halo alrededor de la colonia en estudio.
- Si presenta formación de halo la prueba es positiva.
- Si no presenta la formación de un halo la prueba es negativa.



Fuente: Elaboración propia en base a procedimiento de identificación de *Staphylococcus aureus*

Figura 3-5. Diagrama explicativo de investigación *Staphylococcus aureus*

3.2.5. Detección de coliformes e identificación de *Escherichia coli*

3.2.5.1. Equipos

- Campana de flujo laminar.
- Estufa de cultivo Memmert, modelo INB 500.
- Refrigerador Sindelen, modelo Optimus 4200.
- Microscopio Quimis sin modelo.
- Timer.

3.2.5.2. Materiales

- Aceite de inmersión.
- Papel absorbente desechable.

- Asa de siembra.
- Pinza metálica.

3.2.5.3. Reactivos

- Set tinción Gram.
- Reactivo de Kovacs.
- Indicador rojo metilo.
- Solución alfa naftol.
- Solución de hidróxido de potasio.
- Agua destilada estéril.
- Alcohol etílico al 70%.
- Placa petri con agar V.R.B. (violet red bile).
- Frascos de caldo tripticasa de soya enriquecida con muestra.
- Tubo de ensayo con caldo tripton.
- Tubo de ensayo con agar citrato de Simmons.
- Solución hipoclorito de sodio al 0,5%.

3.2.5.4. Descripción de la actividad

- Rocíar el mesón de la campana de flujo laminar, con alcohol etílico al 70% y secar con papel absorbente desechable, realizar este paso al inicio y al final de la siembra.
- Durante todo el proceso el mechero debe permanecer encendido.
- Dejar en esclusa de carga de materiales, todos los materiales estériles a utilizar.

- Dejar en esclusa de descarga de cultivos todas las placas y frascos inoculados.
- Dejar en esclusa de descarga de materiales todos los materiales utilizados.
- Al entrar por la esclusa de cambio de vestuario se debe cambiar el delantal, colocarse los cubres calzado, toca, mascarilla, guantes e ingresar a la sala de siembra.
- Al salir por la esclusa de cambio de vestuario, cambiarse el delantal, sacarse el cubre calzado, toca, mascarilla y guantes, desechándolos y cruzando la esclusa de tránsito.
- Retirar muestras enriquecidas de caldo tripticasa de soya de la estufa de cultivo, sacar del refrigerador las placas con agar V.R.B (violet red bile).

3.2.5.5. Siembra de muestra

- Encender el mechero y retirar de esclusa de descarga de cultivos, los frascos enriquecidos de caldo tripticasa de soya inoculados con muestra y las placas de agar V.R.B (violet red bile). Depositándolos en el mesón de la campana de flujo laminar. Rotular las placas con la muestra, fecha y tipo de análisis.
- Tomar un frasco agitar, abrir y flamear la boca por el mechero, luego flamear el asa de siembra hasta enrojecer, enfriar, tomar un inóculo con el asa y extenderlo sobre la placa de agar V.R.B (violet red bile) en forma de zigzag.
- Finalizado el traspaso, dejar las placas en esclusa de descarga de cultivos y los frascos en esclusa de descarga de materiales.

3.2.5.6. Incubación

- Incubar las placas con muestra en estufa de cultivo en forma invertida a 35 $\pm$ 2°C por 48 horas.

3.2.5.7. Expresión de resultados

- Si no se observa desarrollo bacteriano en la placa con muestra el resultado se expresa como negativo (ausencia de *Escherichia coli*) por lo tanto, se da término al análisis.
- Si se observa desarrollo bacteriano típico o dudoso, seguir con el análisis, paralelamente.

- Continuar con las pruebas de confirmación.

3.2.5.8. Prueba de confirmación tinción Gram

- Sobre un portaobjeto colocar una gota de agua destilada estéril, con el asa picar una colonia y suspenderla en el agua, fijar al mechero.
- Teñir el frotis con cristal violeta 1 minuto.
- Lavar cuidadosamente con abundante agua durante algunos segundos.
- Cubrir la preparación con lugol, mantener durante 1 minuto y lavar cuidadosamente con abundante agua.
- Decolorar varias veces con alcohol-acetona o alcohol etílico de 95° hasta que no se elimine colorante, posteriormente, lavar con agua corriente (30 seg).
- Teñir con solución de safranina, durante 30 segundos y lavar con abundante agua.
- Secar la preparación.
- Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la zona teñida y observar al microscopio con aumento 100x.
- Se debe observar bacilos gran negativo finos.
- Eliminar portaobjeto en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.

3.2.5.9. Prueba bioquímicas producción de indol

Bajo campana de flujo laminar, tomar el asa de siembra, pasarla por el mechero hasta enrojecer y dejar enfriar, tomar una colonia aislada de la placa de agar V.R.B (violet red bile) e inocular en caldo triptona, flamear la boca del tubo, cerrar, e incubar a 35 +- 2°C por 24 horas. Al término del período de incubación, agregar 2 gotas de reactivo de kovacs.

- Prueba positiva: color rojo intenso en la superficie del medio.
- Prueba negativa: color amarillo.

3.2.5.10. Prueba bioquímicas reacción Voges Proskauer

Bajo campana de flujo laminar, tomar el asa de siembra, pasarla por el mechero hasta enrojecer y dejar enfriar, tomar una colonia aislada de la placa de agar

V.R.B (violet red bile) y traspasar al tubo con 5 mL de caldo RM-VP, flamear la boca del tubo, cerrar, agitar e incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 48 horas. Al término de la incubación, agregar 5 gotas de solución alfa naftol y 2 gotas de solución KOH al 40%. Agitar el tubo. Observar después de 2 horas.

- Prueba positiva: color rosado.
- Prueba negativa: color café pardo.

3.2.5.11. Prueba bioquímicas reacción rojo metilo

Bajo campana de flujo laminar, tomar el asa de siembra, pasarla por el mechero hasta enrojecer y dejar enfriar, tomar una colonia aislada de la placa de agar V.R.B (violet red bile) y traspasar al tubo con 5 mL de caldo RM-VP, flamear la boca del tubo, cerrar, agitar e incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Al término del período de incubación, agregar 5 gotas de solución rojo de metilo.

- Prueba positiva: color rojo.
- Prueba negativa: color amarillo.

3.2.5.12. Prueba bioquímicas citrato de Simmons

Bajo campana de flujo laminar, tomar el asa de siembra, pasarla por el mechero hasta enrojecer y dejar enfriar, tomar una colonia aislada de la placa de agar V.R.B.(violet red bile) y traspasar de agar citrato de Simmons inoculando suavemente en líneas rectas en superficie. Incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 96 horas. Al término de la incubación observar el cambio de color producido en el medio.

- Prueba positiva: color azul.
- Prueba negativa: color verde.

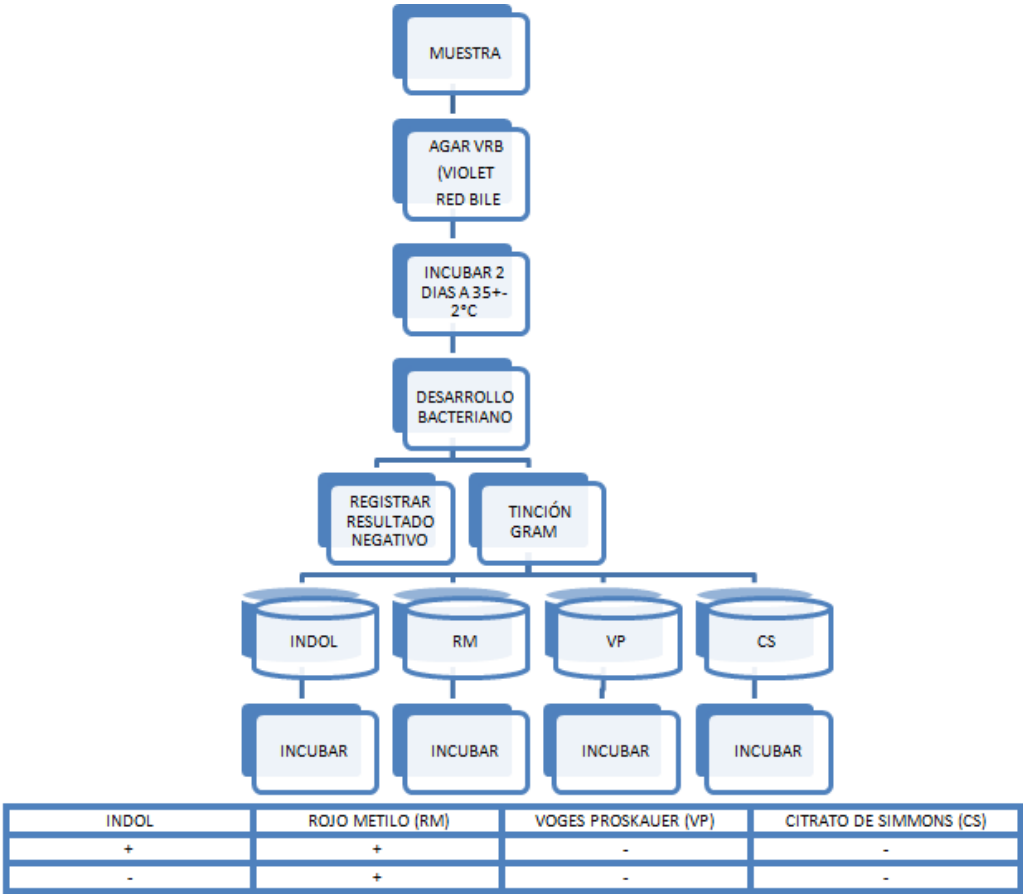
3.2.5.13. Interpretación de pruebas bioquímicas

Es considerado *Escherichia coli* si las pruebas bioquímicas son:

Tabla 3-4. Interpretación de pruebas bioquímicas para identificación de *Escherichia coli*

Indol	Rojo metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
+	+	-	-
-	+	-	-

Fuente: Elaboración propia en base a pruebas bioquímicas



Fuente: Elaboración propia en base a procedimiento de identificación de *Escherichia coli*

Figura 3-6. Diagrama explicativo de detección de coliformes e identificación de *Escherichia coli*

3.2.6. Investigación de *Pseudomona aeuroginosa*

3.2.6.1. Equipos

- Campana de flujo laminar.
- Estufa de cultivo Memmert, modelo INB 500.

- Refrigerador Sindelen, modelo Optimus 4200.
- Microscopio Quimis sin modelo.
- Timer.

3.2.6.2. Materiales

- Aceite de inmersión.
- Pinza metálica.
- Papel absorbente desechable.
- Asa de siembra.
- Varillas indicadoras de oxidasa.

3.2.6.3. Reactivos

- Set tinción Gram.
- Reactivo de Kovacs.
- Indicador rojo metilo.
- Solución alfa naftol.
- Solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Alcohol etílico al 70%.
- Agua destilada estéril.
- Placa petri con agar cetrímide.
- Frascos con 45 mL de caldo triptícase de soya enriquecida con muestra.
- Tubo de ensayo con caldo triptona.
- Tubos de ensayo caldo RM-VP.
- Tubo de ensayo con agar citrato de Simmons.

3.2.6.4. Descripción de la actividad

- Rociar el mesón de la campana de flujo laminar, con alcohol etílico al 70% y secar con papel absorbente desechable, realizar este paso al inicio y al final de la siembra.
- Durante todo el proceso el mechero debe permanecer encendido.
- Dejar en esclusa de carga de materiales, todos los materiales estériles a utilizar.
- Dejar en esclusa de descarga de cultivos todas las placas y frascos inoculados.
- Dejar en esclusa de descarga de materiales todos los materiales utilizados.
- Al entrar por la esclusa de cambio de vestuario se debe cambiar el delantal, colocarse los cubres calzado, toca, mascarilla, guantes e ingresar a la sala de siembra.
- Al salir por la esclusa de cambio de vestuario, cambiarse el delantal, sacarse el cubre calzado, toca, mascarilla y guantes, desechándolos y cruzando la esclusa de tránsito.
- Retirar muestras enriquecidas en caldo tripticasa de soya de la estufa de cultivo y llevar a esclusa de descarga de cultivos, luego tomar del refrigerador placas con agar cetrimide y dejar en esclusa de descarga de cultivos.

3.2.6.5. Siembra de muestras

- Encender el mechero y retirar de la esclusa de carga de materiales, los frascos con caldo tripticasa de soya inoculada con la muestra junto a las placas con agar cetrimide, depositándolos en el mesón de la campana de flujo laminar. Rotular las placas con la muestra, fecha y análisis.
- Tomar un frasco, agitar, abrir y flamear la boca en el mechero, luego flamear el asa de siembra hasta enrojecer, enfriar y tomar un inóculo, extenderlo sobre la placa con agar cetrimide en forma de zigzag.
- Finalizado el traspaso, dejar las placas en la esclusa de descarga de cultivos y los frascos en esclusa de descarga de materiales.

3.2.6.6. Incubación

- Retirar las placas de la esclusa de descarga de cultivos y colocarlas en forma invertida en estufa de cultivo a 35 $\pm$ 2°C por 48 horas.

3.2.6.7. Expresión de resultados

- Si no se observa desarrollo bacteriano en la placa en estudio, el resultado se expresa como negativo (ausencia de *Pseudomona aeuroginosa*), dándose término al análisis.
- Si se observa desarrollo bacteriano seguir con el análisis. Seleccionar las colonias características de *Pseudomona* y realizar las pruebas de confirmación.

3.2.6.8. Pruebas de confirmación test de oxidasa

- Realizar test de oxidasa bajo campana de flujo laminar, en donde se debe picar una colonia aislada con el asa de inoculación y frotar el asa sobre la zona reactiva de la varilla de oxidasa, esperar 60 segundos, comparar la escala colorimétrica impresa en el envase de las varillas indicadoras.
- Si hay viraje hacia un color violeta o púrpura, la reacción es positiva, por lo tanto, seguir con tinción Gram y pruebas bioquímicas para confirmar la presencia de *Pseudomona aeuroginosa*.
- Por lo contrario si no hay viraje de color, la prueba es negativa y el resultado es negativo (ausencia de *Pseudomona aeuroginosa*).

3.2.6.9. Pruebas de confirmación tinción Gram

Bajo campana de flujo laminar, sobre un porta objeto colocar una gota de agua destilada estéril, con el asa tomar una colonia, suspenderla en el agua y fijar al mechero con la ayuda de una pinza metálica.

- Teñir el frotis con cristal violeta 1 minuto.
- Lavar cuidadosamente con abundante agua durante algunos segundos.
- Cubrir la preparación con lugol, mantener durante 1 minuto y lavar cuidadosamente con abundante agua.

- Decolorar varias veces con alcohol-acetona o alcohol etílico de 95° hasta que no se elimine colorante, posteriormente, lavar con agua corriente (30 seg.).
- Teñir con solución de safranina, durante 30 segundos y lavar con abundante agua.
- Secar la preparación.
- Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la zona teñida y observar al microscopio con aumento 100x.
- Se debe observar bacilos gran negativo finos.
- Eliminar portaobjeto en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.

3.2.6.10. Pruebas bioquímicas producción de indol

Bajo campana de flujo laminar, tomar el asa de siembra, pasarla por el mechero hasta enrojecer y dejar enfriar, tomar una colonia aislada de la placa de agar cetrimide y traspasar al tubo con 5 mL de caldo triptona , flamear la boca del tubo, cerrar, e incubar a 35 +- 2°C por 24 horas. Al término del período de incubación, agregar 2 gotas de reactivo de kovacs.

- Prueba positiva: color rojo intenso en la superficie del medio.
- Prueba negativa: color amarillo.

3.2.6.11. Pruebas bioquímicas reacción Voges Proskauer

Bajo campana de flujo laminar, tomar el asa de siembra, pasarla por el mechero hasta enrojecer y dejar enfriar, tomar una colonia aislada de la placa de agar cetrimide y traspasar al tubo con 5 mL de caldo RM-VP, flamear la boca del tubo, cerrar, agitar e incubar a 35 +- 2°C, por 48 horas. Al término de la incubación, agregar 5 gotas de solución alfa naftol y 2 gotas de solución KOH al 40%. Agitar el tubo. Observar después de 2 horas.

- Prueba positiva: color rosado.
- Prueba negativa: color café pardo.

3.2.6.12. Pruebas bioquímicas reacción rojo de metilo

Bajo campana de flujo laminar, tomar el asa de siembra, pasarla por el mechero hasta enrojecer y dejar enfriar, tomar una colonia aislada de la placa de agar tripticasa de cetrimide y traspasar al tubo con 5 mL de caldo RM-VP, flamear la boca del tubo, cerrar, agitar e incubar a 35 +- 2°C por 96 horas (4 días). Al término del período de incubación, agregar 5 gotas de solución rojo de metilo.

- Prueba positiva: color rojo.
- Prueba negativa: color amarillo.

3.2.6.13. Pruebas bioquímicas citrato de Simmons

Bajo campana de flujo laminar, tomar el asa de siembra, pasarla por el mechero hasta enrojecer y dejar enfriar, tomar una colonia aislada de la placa de agar cetrimide y traspasar a agar citrato de Simmons inoculando suavemente en líneas rectas en superficie. Incubar a 35 +- 2°C por 96 horas (4 días). Al término de la incubación observar el cambio de color producido en el medio.

- Prueba positiva: color azul.
- Prueba negativa: color verde.

3.2.6.14. Interpretación de pruebas bioquímicas

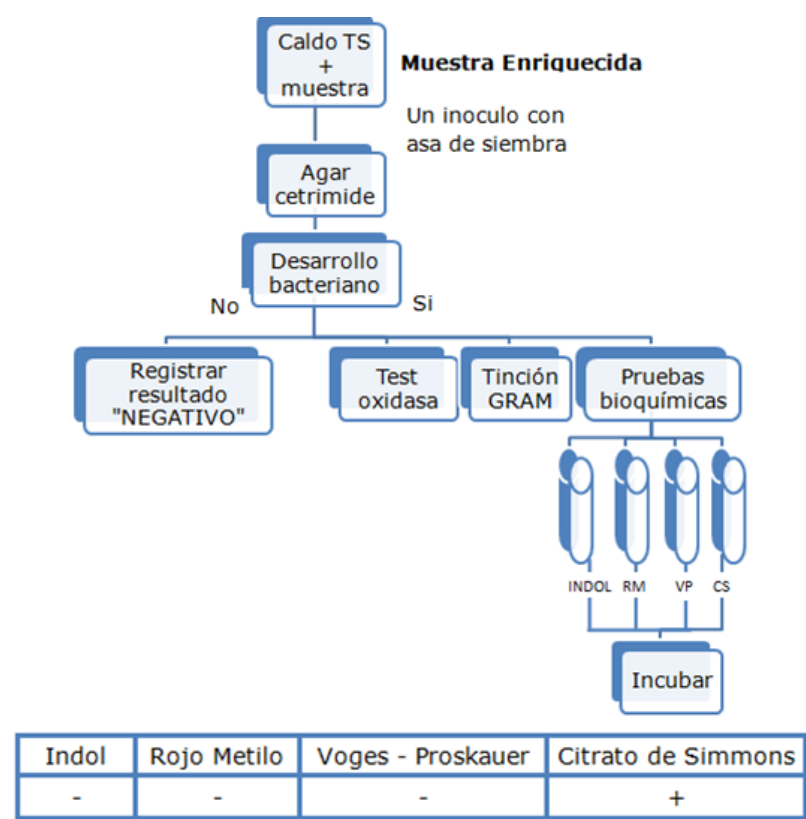
Es considerado *Pseudomona aeuroginosa* positivo si las pruebas bioquímicas son:

Tabla 3-5. Interpretación de pruebas bioquímicas para identificación de *Pseudomona aeuroginosa*

Indol	Rojo Metilo	Voges Proskauer	Citrato de Simmons
-	-	-	+

Fuente: Elaboración propia en base a pruebas bioquímicas

Si la prueba es positiva. Registrar resultado Positivo



Fuente: Elaboración propia en base a procedimiento de identificación de *Pseudomona aeuroginosa*

Figura 3-7. Diagrama explicativo de investigación de *Pseudomona aeuroginosa*

3.2.7. Investigación de *Salmonella spp.*

3.2.7.1. Equipos

- Campana de flujo laminar.
- Estufa de cultivo Memmert, modelo INB 500.
- Refrigerador Sindelen, modelo Optimus 4200.
- Microscopio Quimis sin modelo.
- Timer.
- Balanza digital semi analítica 0,01 g Precisa, modelo XT 300.

3.2.7.2. Materiales

- Aceite de inmersión.
- Pinza metálica.

- Papel absorbente desechable.
- Asa recta de siembra.
- Asa curva de siembra.
- Porta objetos.
- Tubo de ensayo con agua destilada estéril.

3.2.7.3. Reactivos

- Set tinción Gram.
- Placa petri con agar XLD.
- Frascos con 90 mL de agua peptonada tamponada más muestra enriquecida.
- Tubos de ensayo con 10 mL de caldo selenito cistina.
- Tubos de ensayo con agar TSI.
- Tubo de ensayo con agar LIA.
- Tubo de ensayo con agar MIO.
- Reactivo de kovacs.
- Solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Alcohol etílico al 70%.
- Tubo de ensayo con agar citrato de Simmons.

3.2.7.4. Descripción de la actividad

- Durante todo el proceso el mechero debe permanecer encendido.

- Dejar en esclusa de carga de material, todos los materiales estériles a utilizar.
- Dejar en esclusa de descarga de material todos los materiales utilizados.
- Al entrar por la esclusa de cambio de vestuario se debe cambiar el delantal, colocarse los cubre calzado, toca, mascarilla, guantes e ingresar a la sala de siembra.
- Al salir por la esclusa de cambio de vestuario, cambiarse el delantal, sacarse el cubre calzado, toca, mascarilla y guantes, desechándolos y cruzando la esclusa de tránsito.

3.2.7.5. Siembra de muestras

- Encender el mechero y retirar de la esclusa de carga de materiales, los frascos con agua peptonada tamponada, depositándolos en el mesón de la campana de flujo laminar.
- Destapar un frasco de agua peptonada tamponada, colocarlo sobre la balanza, tarar y pesar 10 g $\pm$ 1 g de muestra, flamear la boca y la tapa del frasco, cerrar, agitar, registrar en el frasco la pesada y dejar al lado derecho del mesón.
- Una vez pesada todas las muestra llevar el o los frascos de agua peptonada tamponada con la muestra a incubar en estufa de cultivo a 35 $\pm$ 2°C por 24 horas como medio de enriquecimiento.
- Cumplido el tiempo de incubación tomar un frasco, agitar, abrir y flamear la boca en el mechero, tomar 1 mL y transferir a un tubo de ensayo con 10 mL de caldo selenito cistina e incubar a 35 $\pm$ 2°C por 24 horas como medio de enriquecimiento selectivo.
- Terminado el tiempo de incubación, bajo campana de flujo laminar flamear el asa curva de siembra hasta enrojecer, enfriar y tomar un inóculo del caldo selenito cistina, extenderlo sobre la placa con agar XLD en forma de zigzag.
- Finalizado el traspaso, dejar las placas en la esclusa de descarga de cultivos y los frascos en esclusa de descarga de materiales.

3.2.7.6. Incubación

- Retirar las placas de la esclusa de descarga de cultivos y colocarlas en forma invertida en esclusa de cultivo a 35 $\pm$ 2°C por 48 horas.

3.2.7.7. Expresión de resultados

- Si no se observa desarrollo bacteriano en la placa en estudio, el resultado se expresa como negativo (ausencia de *salmonella spp*), dándose término el análisis.
- Si se observa desarrollo bacteriano, seleccionar las colonias características de salmonellas y realizar las pruebas de confirmación.

3.2.7.8. Pruebas de confirmación tinción Gram

Bajo campana de flujo laminar, sobre un porta objeto colocar una gota de agua destilada estéril, con el asa tomar una colonia, suspenderla en el agua y fijar al mechero con la ayuda de una pinza metálica:

- Teñir con cristal violeta 1 minuto.
- Lavar cuidadosamente con abundante agua durante algunos segundos.
- Cubrir la preparación con lugol, mantener durante 1 minuto y lavar cuidadosamente con abundante agua.
- Decolorar varias veces con alcohol-acetona o alcohol etílico de 95° hasta que no se elimine colorante, posteriormente, lavar con agua corriente (30 seg).
- Teñir con solución de safranina, durante 30 segundos y lavar con abundante agua.
- Secar la preparación.
- Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la zona teñida y observar al microscopio con aumento 100x.
- Se debe observar bacilos gran negativo finos.
- Eliminar portaobjeto en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.

3.2.7.9. Pruebas bioquímicas agar Triple azúcar hierro (TSI)

Bajo campana de flujo laminar, tomar el asa recta de siembra, pasarla por el mechero hasta enrojecer y dejar enfriar. Picar una o más colonias típicas o sospechosas de la placa de agar XLD e inocular el tubo de TSI en profundidad y superficie, flamear la boca del tubo, cerrar e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas.[18]

Fermentación de la glucosa:

- Fermenta la glucosa: fondo amarillo (A).
- No fermenta la glucosa: fondo rojo (K).

Fermentación de la lactosa y/o sacarosa:

- Fermenta estos azúcares: tendido amarillo (A).
- No fermenta lactosa/sacarosa: tendido rojo (K).

Producción de gas:

- Pruebas positiva: ruptura o desplazamiento del agar.
- Prueba negativa: sin cambio en el agar.

Producción de H_2S :

- Prueba positiva: Ennegrecimiento del agar.
- Prueba negativa: sin cambio en el agar.

3.2.7.10. Pruebas bioquímicas agar hierro lisina (LIA)

Bajo campana de flujo laminar, tomar el asa recta de siembra, pasarla por el mechero hasta enrojecer y dejar enfriar. Picar la misma colonia tomada para el TSI de la placa de agar XLD e inocular el tubo de LIA en profundidad y superficie, flamear la boca del tubo, cerrar e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. [19]

Decarboxilación de lisina:

- Prueba positiva: fondo y tendido color púrpura (K/K).

- Prueba negativa: fondo amarillo (A).

Producción de H₂S:

- Prueba positiva: ennegrecimiento del agar.
- Prueba negativa: sin cambio en el agar.

Producción de gas

- Prueba positiva: ruptura o desplazamiento del agar.
- Prueba negativa: sin cambio en el agar.

Desaminación de lisina:

- Prueba positiva: tendido color rojo (R).
- Prueba negativa: tendido púrpura (A).

3.2.7.11. Pruebas bioquímicas agar movilidad indol ornitina (MIO)

Bajo campana de flujo laminar, tomar el asa de siembra, pasarla por el mechero hasta enrojecer y dejar enfriar. Picar una o más colonias típicas o sospechosas de la placa de agar XLD e inocular el tubo de MIO en picadura, flamear la boca del tubo, cerrar e incubar a 35 ± 2°C por 24 horas.[20]

Producción de indol: al término del período de incubación, agregar 2 gotas de reactivo de Kovacs.

- Prueba positiva: color rojo intenso en la superficie del medio.
- Prueba negativa: color amarillo.

Producción de ornitina: la producción de ornitina conlleva a una acidificación del medio por la descarboxilación de la ornitina.

- Prueba positiva: no se produce cambio color en el medio (azul-violeta).
- Prueba negativa: color amarillo.

Prueba de movilidad:

- Prueba positiva: desarrollo difuso en el medio.
- Prueba negativa: desarrollo en línea recta.

3.2.7.12. Pruebas bioquímicas citrato de Simmons

Bajo campana de flujo laminar, tomar el asa de siembra, pasarla por el mechero hasta enrojecer y dejar enfriar, tomar una colonia aislada de la placa de agar XLD y traspasar a agar citrato de Simmons inoculando suavemente en líneas rectas en superficie. Incubar a 35 +- 2°C por 96 horas. Al término de la incubación observar el cambio de color producido en el medio.

- Prueba positiva: color azul.
- Prueba negativa: color verde.

3.2.7.13. Interpretación de pruebas bioquímicas

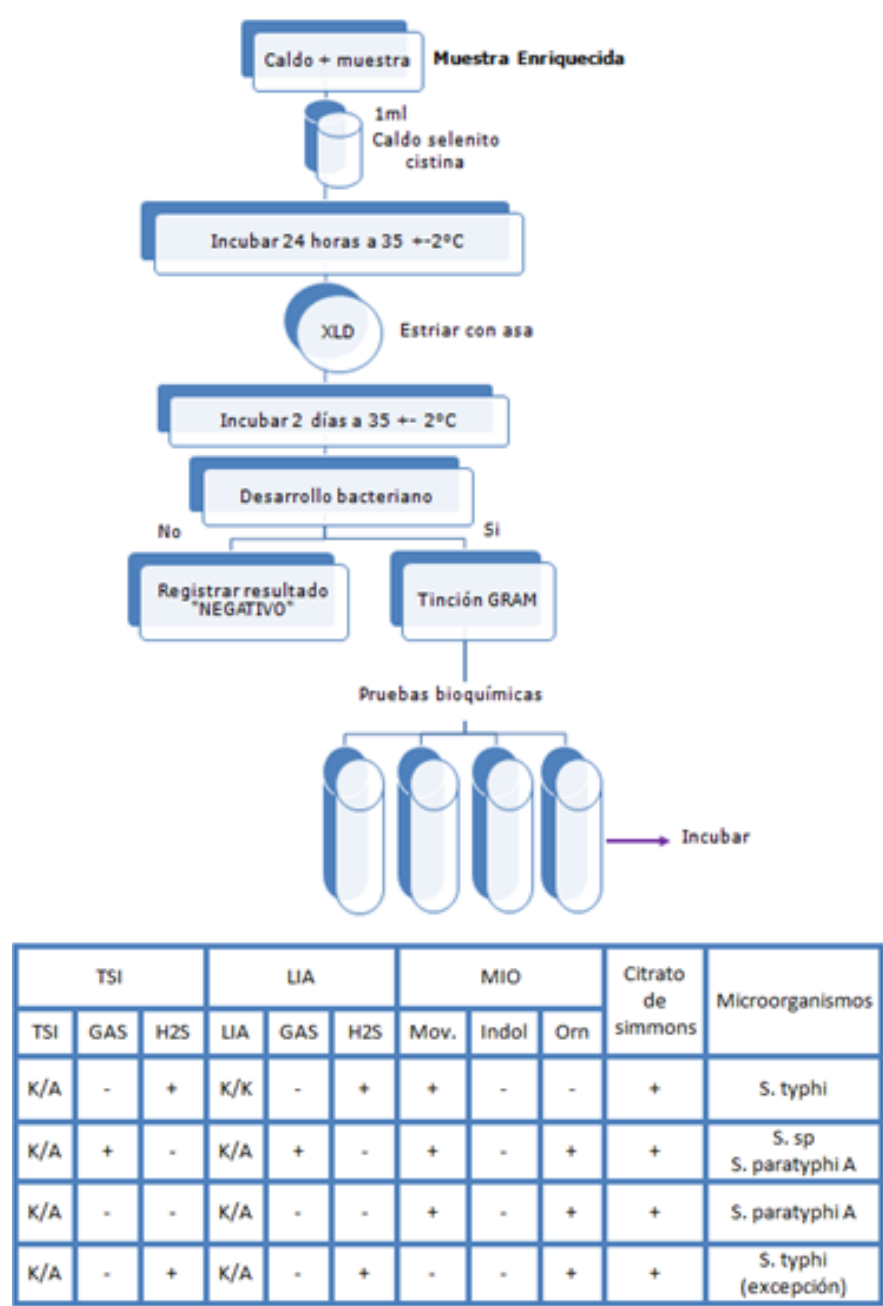
Es considerado *Salmonella spp* si las pruebas bioquímicas son:

Tabla 3-6. Interpretación de pruebas bioquímicas para identificación de *Salmonella spp*

TSI			LIA			MIO			Citrato de Simmons	Microorganismos
TSI	Gas	H ₂ S	LIA	Gas	H ₂ S	Mov.	Indol	Orn		
K/A	-	+	K/K	-	+	+	-	-	+	S. typhi
K/A	+	-	K/A	+	-	+	-	+	+	S. sp S. paratyphi A
K/A	-	-	K/A	-	-	+	-	+	+	S. paratyphi A
K/A	-	+	K/A	-	+	-	-	+	+	S. typhi (excepción)

Fuente: Elaboración propia en base pruebas bioquímicas

Si la prueba es positiva registrar resultado positivo.



Fuente: Elaboración propia en base a procedimiento de identificación de *Salmonella* spp

Figura 3-8. Diagrama explicativo de investigación de *Salmonella* spp

3.3. **PROCEDIMIENTOS ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICOS**

3.3.1. Determinación de características organolépticas

3.3.1.1. Materiales

- Vasos de precipitado de 50 mL.
- Vidrio reloj.

3.3.1.2. Descripción de la actividad

Realizar las siguientes actividades:

- Aspecto: la muestra a inspeccionar ocularmente y el estándar de la misma, se colocan por separado cada una en un vaso de precipitado de 50 mL, y se comparan entre sí.
- Color: se coloca la muestra y el estándar en vidrios de reloj y se comparan. El color de ambas debe ser coincidentes.
- Olor: la muestra y el estándar se le toma el aroma en forma independiente a cada uno y se comparan. El aroma debe ser coincidente.
- Gusto: cuando la especificación del producto lo indique, se debe probar el sabor de la muestra y del estándar independientemente enjuagando la boca entre cada comparación. El sabor debe ser el mismo.

3.3.2. Determinación de pH

3.3.2.1. Equipos

- Balanza Digital Analítica Precisa, modelo XT220A.
- PH metro Hanna, modelo Edge.
- Estufa Memmert, modelo V70.

3.3.2.2. Materiales

- Vaso de precipitado de 100 mL.
- Vaso de precipitado de 150 mL.

3.3.2.3. Descripción de la actividad

Realizar las siguientes actividades:

- En un vaso de precipitado de 150 mL colocar una cantidad de muestra suficiente (3/4 partes del volumen del vaso). Si la medición es en solución, se debe pesar la cantidad de tal forma de hacer una solución peso/peso, completando los 100 gramos de diferencia con agua desionizada, agitando hasta disolución total de la muestra.

- Medir el pH directamente a la solución en un pH metro marca Hanna, según la descripción de uso del equipo.

3.3.3. Determinación de viscosidad

3.3.3.1. Equipos

- Viscosímetro Rotacional Brookfield LVDVE 230.

3.3.3.2. Materiales

- Vaso de precipitado de 100 mL.
- Vaso de precipitado de 150 mL.
- Vaso de precipitado de 600 mL.
- Termómetro.

3.3.3.3. Descripción de la actividad

Realizar las siguientes actividades:

- Preparar la muestra y el viscosímetro, y colocar la muestra ambientada bajo el viscosímetro, debajo de la aguja y para mediciones standard, bajando la caja de comando helipath y sumergir la aguja hasta el nivel de inmersión, centrada, cuidando que no quede en contacto con burbujas de aire.
- Transcurrido 1 minuto, registrar viscosidad obtenida.
- Retirar la muestra y lavar la aguja con agua desionizada, luego secar.
- Para mediciones con sistema helipath, colocar la muestra ambientada bajo el viscosímetro debajo de la aguja, centrarla y colocar la cruz a ras de la superficie de la muestra.
- Encender el interruptor del sistema helipath y la tecla frontal MOTOR ON ubicada en la caja de comando del viscosímetro.

- Transcurrido 1 minuto, anotar el dato de viscosidad.
- Retirar la muestra y lavar la aguja con agua desionizada, luego secar.

3.3.4. Determinación de pruebas de estabilidad

3.3.4.1. Equipos

- Centrifuga Quimis.
- Estufa Memmert, modelo V70.

3.3.4.2. Descripción de la actividad

Realizar las siguientes actividades:

- Fabricada la crema se miden todos sus parámetros químicos y microbiológicos, luego de esto se deja a una temperatura constante de 40°C durante un mes.
- Transcurrido el mes se procede a medir nuevamente los parámetros químicos para verificar estabilidad del pH, viscosidad y la muestra se centrifuga para prevenir la separación del extracto.
- Finalmente se terminó las pruebas de estabilidad tras 3 meses de análisis, volviendo a realizar los ensayos cada un mes todos sus parámetros químicos.

Nota: las muestras se les practicaran las pruebas de estabilidad solo por dos meses. La estabilidad térmica de la crema nos da la vida útil del producto, en este caso para tres meses de estudio, la vida útil correspondería a 36 meses. En el caso de las cremas analizadas sería de 24 meses.

3.4. **ANÁLISIS DE DATOS**

A los resultados obtenidos de las pruebas químicas se les realizará una media aritmética, para así tener un único valor representativo para cada muestra, el cual nos ayudará a reflejar de mejor manera si la muestra se encuentra dentro de los parámetros permitidos y tener un valor teórico ideal en las cremas piloto.

3.5. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

3.5.1. Media aritmética

$$\bar{x} = \frac{n_1 + n_2 + \dots + n_x}{N}$$

nx: datos obtenidos.
N: cantidad de datos obtenidos

CAPÍTULO 4: DESARROLLO EXPERIMENTAL

4. **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

4.1. **PRUEBAS FISICO - QUÍMICAS**

Las pruebas realizadas a las tres cremas elaboradas son pH, viscosidad y estabilidad, los cuales se realizaron mensualmente (dos meses) arrojando los siguientes resultados.

Tabla 4-1. Análisis físico - químicos realizados al inicio de las pruebas de estabilidad

Cremas	pH	Viscosidad (cps)	Est. Centrífuga
Fórmula 1	6,45	225.000	No presenta separación.
Fórmula 2	6,64	226.900	No presenta separación.
Fórmula 3	6,63	240.600	No presenta separación.

Fuente: Elaboración propia en base a investigación realizada

Tabla 4-2. Análisis físico - químicos realizados al primer mes transcurrido las pruebas de estabilidad

Cremas	pH	Viscosidad (cps)	Est. Centrífuga	Est. Térmica (40°C) por un mes
Fórmula 1	6,46	225.600	No presenta separación.	Estable durante el tiempo.
Fórmula 2	6,58	296.300	No presenta separación.	Estable durante el tiempo.
Fórmula 3	6,54	221.300	No presenta separación.	Estable durante el tiempo.

Fuente: Elaboración propia en base a investigación realizada

Tabla 4-3. Análisis físico - químicos realizados al segundo mes transcurrido las pruebas de estabilidad

Cremas	pH	Viscosidad (cps)	Est. Centrífuga	Est. Térmica (40°C) por un mes
Fórmula 1	6,47	226.100	No presenta separación.	Estable durante el tiempo.
Fórmula 2	6,57	298.400	No presenta separación.	Estable durante el tiempo.
Fórmula 3	6,50	221.500	No presenta separación.	Estable durante el tiempo.

Fuente: Elaboración propia en base a investigación realizada

4.2. **PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS**

Las pruebas realizadas a las tres cremas elaboradas son hongos y levaduras, aerobios mesófilos y patógenos (*Escherichia Coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*), los cuales se realizaron mensualmente (dos meses) arrojando los siguientes resultados.

A los extractos se les practicó los análisis microbiológicos solo al inicio, para así conocer la presencia y/o cuantificación de microorganismos en está.

Tabla 4-4. Análisis microbiológicos realizados a los extractos

Extractos	Hongos y Levaduras (u.f.c./g)	Aerobios Mesófilos (u.f.c./g)	Patógenos (u.f.c./g)
E. Aceite de Oliva	< 10	15	Ausencia
E. Propilenglicol/Agua	< 10	20	Ausencia

Fuente: Elaboración propia en base a investigación realizada

Tabla 4-5. Análisis microbiológicos realizados al inicio de las pruebas de estabilidad

Cremas	Hongos y Levaduras (u.f.c./g)	Aerobios Mesófilos (u.f.c./g)	Patógenos (u.f.c./g)
Fórmula 1	< 10	< 10	Ausencia
Fórmula 2	< 10	< 10	Ausencia
Fórmula 3	< 10	< 10	Ausencia

Fuente: Elaboración propia en base a investigación realizada

Tabla 4-6. Análisis microbiológicos realizados al primer mes transcurrido las pruebas de estabilidad

Cremas	Hongos y Levaduras (u.f.c./g)	Aerobios Mesófilos (u.f.c./g)	Patógenos (u.f.c./g)
Fórmula 1	< 10	< 10	Ausencia
Fórmula 2	< 10	< 10	Ausencia
Fórmula 3	< 10	< 10	Ausencia

Fuente: Elaboración propia en base a investigación realizada

Tabla 4-7. Análisis microbiológicos realizados al segundo mes transcurrido las pruebas de estabilidad

Cremas	Hongos y Levaduras (u.f.c./g)	Aerobios Mesófilos (u.f.c./g)	Patógenos (u.f.c./g)
Fórmula 1	< 10	< 10	Ausencia
Fórmula 2	< 10	< 10	Ausencia
Fórmula 3	< 10	< 10	Ausencia

Fuente: Elaboración propia en base a investigación realizada

4.3 **CÁLCULOS**

4.3.1. Resultados pH

Tabla 4-8. Valores de pH obtenidos

Cremas	PH Inicial	PH Primer Mes	PH Segundo Mes
F1	6,45	6,46	6,47
F2	6,64	6,58	6,57
F3	6,63	6,54	6,50

Fuente: Elaboración propia en base a investigación realizada

$$\bar{x} = \frac{6,45 + 6,46 + 6,47}{3} = 6,46$$

$$\bar{x} = \frac{6,64 + 6,58 + 6,57}{3} = 6,70$$

$$\bar{x} = \frac{6,63 + 6,54 + 6,50}{3} = 6,56$$

4.3.2. Resultados viscosidad

Tabla 4-9. Valores de viscosidad obtenidos

Cremas	Viscosidad Inicial	Viscosidad Primer Mes	Viscosidad Segundo Mes
F1	225.000	225.600	226.100
F2	226.900	296.300	298.400
F3	240.600	221.300	221.500

Fuente: Elaboración propia en base a investigación realizada

$$\bar{x} = \frac{225.000 + 225.600 + 226.100}{3} = 225.567$$
$$\bar{x} = \frac{226.900 + 296.300 + 298.400}{3} = 273.867$$
$$\bar{x} = \frac{240.600 + 221.300 + 221.500}{3} = 227.800$$

4.4. RESULTADOS VISUALES



Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en terreno

Figura 4-1. Modelo N°1 de fórmula 2



Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en terreno

Figura 4-2. Modelo N°2 de fórmula 2



Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en terreno

Figura 4-3. Modelo N°3 de fórmula 2



Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en terreno

Figura 4-4. Modelo N°4 de fórmula 2



Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en terreno

Figura 4-5. Modelo N°1 de fórmula 1



Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en terreno

Figura 4-6. Modelo Nº 2 de fórmula 1



Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en terreno

Figura 4-7. Modelo Nº3 de fórmula 1



Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en terreno

Figura 4-8. Modelo N°4 de fórmula 1



Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en terreno

Figura 4-9. Modelo N°1 de fórmula 3



Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en terreno

Figura 4-10. Modelo N°2 de fórmula 3



Fuente: Elaboración propia, fotografía tomada en terreno

Figura 4-11. Modelo que utilizó en lado izquierdo fórmula 1 y en lado derecho fórmula 2

Al observar todos los parámetros e imágenes expuestas con anterioridad, se puede visualizar que se genera un cambio positivo, porque hay cambios significativos en la piel. En ambas cremas se observa el mismo beneficio

DISCUSIÓN

Buscando una solución a la presencia de problemas cutáneos como acné y/o manchas generado por diversos motivos, se investigó la forma de desarrollar un producto utilizando el extracto de la planta *Taraxacum officinale*, el cual ha sido mencionado en sitios de internet no formales, que lo destacan por sus propiedades que ayudan a disminuir, controlar o eliminar la presencia de erupciones y manchas.

El objeto principal de esta investigación fue determinar la eficacia de los dos extractos obtenidos de *Taraxacum officinale*, uno extraído en aceite de oliva y el segundo en propilenglicol/agua, los que combinados con una base ligera (no grasa) en forma separada concretaron en dos cremas piloto. Además se elaboró una tercera crema utilizando solamente la base ligera para visualizar los efectos de ésta sin considerar el extracto (muestra control).

Para la elaboración de los productos piloto se tuvo que establecer los límites físico - químicos de éste realizando análisis de ensayo y error:

- Viscosidad entre 150.000 cps - 350.000 cps; para obtener este parámetro se probó con diferentes consistencias hasta llegar a los límites deseados.
- PH entre 5 - 7; para obtener este parámetro se basó en una muestra de otro producto cosmético, porque el decreto supremo 239 del año 2002 del I.S.P. no especifica límite máximo y mínimo en pH y viscosidad.
- Microbiológico; basado en la resolución del decreto 239 de 2002, se obtuvo los límites máximos permitidos por el I.S.P.; véase anexo 1.

A estas muestras se les practicó análisis físico - químicos y microbiológicos para asegurar su estabilidad e inocuidad para el uso en modelos de prueba, además de obtener la fecha de caducidad del producto. Estos análisis se realizaron en un periodo de dos meses obteniendo datos cada 30 días. El resultado de los análisis demostraron que las muestras estaban dentro de los parámetros permitidos, siendo señalados en las tablas 4-1, 4-2, 4-3, 4-5, 4-6 y 4-7. En las pruebas de estabilidad en centrifuga y térmica no se observó ninguna problemática, reflejando con esto la duración de las muestras que en dos meses nos da una fecha de caducidad de 24 meses. A los extractos sólo se les realizó pruebas microbiológicas al inicio de la investigación, observándose formación de colonias en los dos extractos en aerobios mesófilos, aun así se mantiene dentro de los parámetros permitidos; véase tabla 4-4.

Los resultados estadísticos tanto del pH como de la viscosidad permitieron visualizar el promedio teórico para las muestras piloto.

Cambios obtenidos en los modelos:

- Figura 4-1: Eliminación de 2 erupciones constantes y disminución del color rojizo.
- Figura 4-2: No se observan cambios.
- Figura 4-3: Disminución del acné, color rojizo y manchas provocadas por el acné.
- Figura 4-4: Disminución color rojizo (tratamiento interrumpido a los 30 días por el modelo).
- Figura 4-5: Eliminación de erupciones constante, disminución color rojizo y desinflamación de la zona afectada.
- Figura 4-6: Disminución de manchas provocadas por el acné y desinflamación de la zona afectada.
- Figura 4-7: No se observa cambio en manchas.
- Figura 4-8: Leve atenuación en manchas.
- Figura 4-9: No se observan cambio.
- Figura 4-10: No se observan cambios.
- Figura 4-11: El modelo se aplicó dos tipos de cremas (F1 y F2). Se observó desinflamación y disminución de acné, color rojizo y manchas.

Resumiendo el efecto entregado por estas cremas (F1 y F2) confirman que la eficacia del extracto se mantiene a través de éste y no varía a pesar del tratamiento de elaboración de la crema y los distintos solventes utilizados en los extractos, observándose los mismos beneficios en ambos.

Cabe mencionar que esta crema no alcanzó en un 100% los objetivos mencionados, porque fue eficaz en el control del acné pero no por completo en el tema de las manchas, pero en algunos casos en los modelos se ve reflejado una leve disminución en la coloración de las manchas lo que podría conllevar a disminución mayor o eliminación si se perdura en el tiempo. También se observó en todos los casos que hubo una eliminación de los puntos negros aplicada por una semana el producto, pero esto no se observa en detalle en las imágenes expuestas.

Para finalizar cabe mencionar que estas cremas no sirven para una eliminación permanente del acné, porque el problema cutáneo se mantendría con mayor control con una buena alimentación y una buena higiene facial o en donde se

aplique el producto, lo que conlleva a que este sólo sea un controlador en vez de un eliminador.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En base al trabajo realizado anteriormente y a los resultados que se exponen en las tablas y registros fotográficos. Se puede concluir que:

- La eficacia de los extractos se mantiene en los productos cosméticos elaborados.
- Los extractos a pesar de presentar recuento de aerobios mesófilos está dentro de los límites establecidos por la autoridad sanitaria y es inocuo para el uso de humanos.
- Las cremas elaboradas con los extractos permanecen estables en el tiempo sin presentar separación ni contaminación y manteniendo todos sus parámetros químicos y organolépticos.
- Las cremas elaboradas obtuvieron los mismos resultados positivos, no teniendo diferencias.
- Con los parámetros estadísticos se pudo obtener valores teóricos, para obtener un valor real en las cremas.

Con respecto a los registros fotográficos se puede apreciar que el extracto posee las siguientes propiedades:

- Disminuir la inflamación en zonas afectadas.
- Eliminación de puntos negros.
- Atenuar enrojecimiento producido por el acné.
- Suavizante.
- Anti manchas (por ser extractos naturales su efecto se ve a lo largo del tiempo y con su uso prolongado, en este caso fue por un periodo de solo dos meses en los cuales se observa disminución del color de las manchas).

BIBLIOGRAFÍA

1. HERBOLARIA. Características y composición de lactonas sesquiterpénicas. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: <http://prontuariodefarmacopea.blogspot.com/2012/07/lactonas-sesquiterpenicas.html>
2. SALUD.ES. Descripción, composición y usos del diente de león. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: <http://www.salud.es/principio/diente-de-leon-taraxacum-officinale>
3. TAUJA. REPOSITORIO DE TRABAJOS ACADÉMICOS DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN. Información sobre triterpenos pentacíclicos. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: <http://tauja.ujaen.es/handle/10953.1/561>
4. MONOGRAFIAS.COM S.A. Información de los carotinoides. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos90/la-quimica-alimentos/la-quimica-alimentos2.shtml>
5. CONSEJOS DE NUTRICIÓN. Información de la Inulina y sus usos. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: <http://www.consejosdenutricion.com/que-es-la-inulina-y-para-que-sirve/>
6. VITONICA. Los efectos protectores de la luteína. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: <http://www.vitonica.com/alimentos-funcionales/los-efectos-protectores-de-la-luteina>
7. NATURVIDA, CONTENIDOS DIGITALES 2008-2015. Información sobre los mucílagos. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: <http://www.natursan.net/mucilagos-beneficios-y-propiedades/>
8. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. Estudio de la luteolina en plantas. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/is/espanol/pr/2010/100708.es.htm>
9. PROPILENGLICOL. Información sobre el propilenglicol. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: <http://propilenglicol.com/usos/>

10. ZONADIET.COM. Composición y beneficios de aceite de oliva. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: <http://www.zonadiet.com/comida/aceite-oliva-pt2.htm>
11. UNIVERSITAT DE BARCELONA. Extracción con disolventes. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_fona.html
12. FACULTAD DE QUÍMICA – UNAM. Información sobre las pruebas bioquímicas. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U3c_PruebasBioquimicas_17461.PDF
13. LABORATORIOS BRITANIA S.A. Información sobre TSI Agar. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/tsiagar.htm>
14. LABORATORIOS BRITANIA S.A. Información sobre Lisina de hierro Agar [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: ["http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/lisinahierroagar.htm"](http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/lisinahierroagar.htm)
15. LABORATORIOS BRITANIA S.A. Información sobre medio MIO. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: <http://britanialab.com.ar/esp/productos/b02/miomedio.htm>
16. LABORATORIOS BRITANIA S.A. sobre DNAsa Agar. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/dnasagar.htm>
17. WIKIPEDIA. INC. Información sobre pruebas bioquímicas. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: ["http://es.wikipedia.org/wiki/Prueba_bioqu%C3%ADmica"](http://es.wikipedia.org/wiki/Prueba_bioqu%C3%ADmica)
18. BLOG REMEDIOS DE LA ABUELITA. Información sobre diente de león. [en línea]. [Consulta: Octubre de 2014]. Disponible en: <http://remediosabuelita.blogspot.com/p/60.html>

ANEXO A: EXTRACTO DEL DECRETO SUPREMO 239 DE 2002 DEL I.S.P.

Santiago,

Visto estos antecedentes: lo dispuesto en el Reglamento del Sistema Nacional de Control de Cosméticos; Decreto Supremo 239 de 2002, respecto a la declaración técnica de productos cosméticos, con relación al artículo 5º letra m), 26º letra b), artículos 54º, 56º, 58º del citado reglamento, el informe técnico respectivo que define las características; y

Teniendo presente: las disposiciones de los artículos 94 y 102 del Código Sanitario, del Reglamento del Sistema Nacional de Control de Cosméticos; D.S.239 de 2002, del Ministerio de Salud y en uso de las facultades que me confiere la letra b) del artículo 39 del decreto ley Nº 2763 de 1979, dicho la siguiente:

RESOLUCIÓN

1.- Entiéndase para efectos de este reglamento, como Especificaciones de Producto Terminado para productos cosméticos, las Especificaciones de Producto Terminado para productos cosméticos, las especificaciones técnicas mínimas, que a continuación se señalan, agrupadas según su finalidad cosmética:

1.1.- Emulsiones, Suspensiones, Soluciones, Geles, Pastas:

Tales como jabones líquidos, shampoo, bálsamo, acondicionador, protectores solares, bronceadores, blanqueadores de la piel, alisador de cabello, ondulador de cabello, neutralizantes, crema para rostro y cuerpo, geles para rostro y cuerpo, máscara de pestañas, delineadores líquidos, bálsamos labiales, desmaquilladores, lociones tónicas, crema para afeitar y para después de afeitar, máscara faciales, enjuagues capilares, enjuagues bucales, toallas húmedas, base de maquillaje, dentífricos, etc.

- Características organolépticas (Aspecto, Color, Olor).
- pH.
- Viscosidad.
- Control microbiológico (cuando corresponda).

1.3- Polvos:

A modo de ejemplo sombras de ojos, desodorantes, polvos faciales, polvos corporales, dentífricos, talcos, etc.

- Características organolépticas (Aspecto, Color, Olor).
- Tenuidad del polvo.
- Ausencia de cristales en forma de agujas.
- Control microbiológico (cuando corresponda).

1.4.- Aerosoles:

Acuoso, hidroalcohólico, sólido, emulsión, solución, etc.

Los controles deberán realizarse de acuerdo a las diferentes formas cosméticas, además de los siguientes:

- Control de fuga.
- Corrosión de envase y/o alteración del concentrado.
- Relación concentrado propelente.

1.5.- Ungüentos, lociones y cremas anhidras, aceites, ceras:

Tales como labiales en barra y lápices, lápiz delineador de ojos, lápiz delineador de cejas, aceite para rostro y cuerpo, sombra de ojos, rubor, brillo de labios, depilatorios, jabones en barra, etc.

- Características organolépticas (Aspecto, Color, Olor).
- Control microbiológico (cuando corresponda).
- Alcalinidad libre en el caso de jabones.

2.- Los límites máximos permitidos en el control microbiológico corresponden a los siguientes:

Cosméticos en general:

- Aerobios mesófilos: no más de 1000 u.f.c./g de producto.

- Hongos y levaduras: no más de 100 u.f.c./g de producto.
- Ausencia de microorganismos patógenos comprendiendo en ellos *E. coli*, Salmonellas, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Cosméticos para el área ocular, productos que entran en contacto con mucosas, productos para rasurar la barba y después de rasurarla y cosméticos infantiles (niños menores de 6 años):

- Aerobios mesófilos: no más de 500 u.f.c./g de producto.
- Hongos y levaduras: no más de 100 u.f.c./g de producto.
- Ausencia de microorganismos patógenos comprendiendo en ellos *E. coli*, Salmonellas, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Aquellos productos que por si formulación o características físico-químicas puedan acreditar técnicamente (composición, prueba de eficacia del sistema preservante, etc) que se encuentran dentro de los rangos permitidos, no será necesario realizar los estudios microbiológicos antes señalados.

3.- Los productos señalados para cada forma cosmética, son sólo ilustrativa, cualquier otro producto que no se encuentre señalado en esta lista deberá someterse a los controles de calidad según la forma cosmética que le corresponda.

4.- Para los productos que a continuación se señalan, además de las especificaciones de producto terminado antes descritas, será necesario **IDENTIFICAR y VALORAR** él o los ingredientes que den cuenta de su acción específica, o constituyan riesgo:

- Champú Anticaspa.
- Desodorante y/o Antisudorales.
- Protectores solares.
- Pastas Dentales con Flúor.
- Depilatorios.
- Alisantes para el cabello.
- Ondulantes para el cabello.

- Tinturas para el cabello.
- Activadores del color.
- Decolorantes del cabello.

5.- Los titulares de los registros de productos cosméticos que no cumplan con al menos las especificaciones aquí señaladas, tienen un plazo de 120 días, a contar de la fecha de publicación en el Diario Oficial, para efectuar las modificaciones a las especificaciones de calidad en la forma que se indica en la presente resolución.

ANOTESE, COMUNIQUESE Y PUBLIQUESE



DRA. Q.F. PAMELA MILLA NANJARÍ
DIRECTORA
INSTITUTO DE SALUD PUBLICA DE CHILE