

Evaluación de seguridad y test de eficacia de la conservación del “Champú Preventivo Junior RF”

Raquel Arbeteta García^{1,2}, Alicia López García², Sonia González Cesisergue²

¹ Departamento de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. ² Laboratorio Rueda Farma, 28850, Torrejón de Ardoz, Madrid, España.

Resumen

Para cumplir la normativa europea en cuanto a seguridad de cosméticos, los laboratorios responsables de los productos cosméticos deben cumplir una serie de requisitos, entre los cuales se incluye la realización y presentación de un expediente que certifique su seguridad. Este expediente debe elaborarse siguiendo las directrices y recomendaciones recogidas por la legislación en vigor, como son el Reglamento 1223/2009, el Reglamento 1907/2006, el Real Decreto 209/2005 y la Norma ISO 11930, aprobados por diferentes organismos, entre ellos la Unión Europea. Este trabajo se centra en la elaboración de dos de los elementos más importantes del Expediente de Seguridad del producto cosmético “Champú Preventivo Junior RF”, que son la evaluación de seguridad y el test de eficacia del conservante a la resistencia microbiológica o Challenge Test al que se somete.

Palabras clave: Cosmético; Reglamento 1223/2009; Expediente; Seguridad; Evaluación; Conservante; Challenge Test.

Cita: Raquel Arbeteta García, Alicia López García, Sonia González Cesisergue (2015) Evaluación de seguridad y test de eficacia de la conservación del “Champú Preventivo Junior RF”. *Dianas* 4(1): e20150902. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20150902. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 26 de junio de 2015

Copyright: © 2015 Raquel Arbeteta García et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

***E-mail:** raquelarbe@gmail.com



Introducción

Se ha definido como **producto cosmético** a toda aquella sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos), con el fin exclusivo o principal de limpiarlas, perfumarlas, modificar su aspecto, protegerlas, mantenerlas en buen estado o corregir los olores corporales [1].

Todos los laboratorios responsables de un producto cosmético tienen la obligación de elaborar un expediente evaluando el posible riesgo toxicológico de cada ingrediente [1,5,6]. Su finalidad es la de demostrar su seguridad mediante la evaluación del producto para, en las condiciones de utilización esperadas, determinar que es seguro. Para ello, en esta evaluación debe incluirse: la fórmula cualitativa del producto, la existencia de restricciones o reglamentaciones específicas –si las hubiera– de los ingredientes, sus datos toxicológicos, las posibles interacciones con otras sustancias, su capacidad de absorción y el margen de seguridad para los ingredientes que así lo dispongan. Además, deben realizarse ensayos de la eficacia del conservante o Challenge Test, que permiten determinar si en determinada concentración existe desarrollo microbiológico que pueda comprometer la seguridad del producto, así como un test para comprobar la estabilidad del cosmético.

A la hora de elaborar este expediente, es necesario conocer, en primer lugar, la legislación vigente que describe los requisitos para desarrollarlo y la información que debe presentarse en relación a los ingredientes que conforman el producto.

Actual legislación

Reglamento (CE) nº 1223/2009

La normativa española de cosméticos, vigente desde 1997, fue modificada con la entrada en vigor el 13 de julio de 2013 de una nueva normativa de la Unión Europea: el Reglamento (CE) nº 1223/2009, que sustituye en Europa la Directiva 76/768/CEE.

Se refiere sólo a los cosméticos y no a los medicamentos, los productos sanitarios o los biocidas, y se elaboró con el propósito de introducir nuevos cambios que garantizaran la seguridad para los

consumidores, velando por la composición y el etiquetado de los productos, y prohibiendo los experimentos con animales [1].

El Portal Europeo de Notificación de Productos Cosméticos (CPNP: *Cosmetic Products Notification Portal*) [14] se creó a raíz de este Reglamento. Se trata de una base de datos en la que se recoge la información y fórmula cuali-cuantitativa de los cosméticos del mercado europeo aportada por la industria cosmética. Esta información es crucial, ya que si se produce alguna reacción alérgica o efecto adverso los institutos toxicológicos de cualquier estado miembro pueden consultarla, tratar los casos rápidamente y realizar un mejor control del mercado. La notificación de información al Portal Europeo era voluntaria antes de la entrada en vigor del Reglamento, convirtiéndose en obligatoria a partir de 2013.

El Reglamento, dentro de los requisitos relativos a la composición de un cosmético, describe las sustancias que no pueden contener los productos, como son aquellas prohibidas (enumeradas en el Anexo II), sujetas a márgenes de restricción (Anexo III) y aquellos colorantes, conservantes y filtros ultravioletas distintos a los enumerados (Anexo IV, V y VI, respectivamente). Es en el Artículo 10 donde se describen las características que debe tener el Expediente de Seguridad de un cosmético, mientras que en el Artículo 3 se especifica la obligación de asegurar la estabilidad y resistencia microbiológica del conservante.

Reglamento (CE) nº 1907/2006

Se denomina REACH, acrónimo de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y mezclas químicas. Entró en vigor el 1 de junio de 2007, siendo su objetivo principal mejorar y garantizar la protección para la salud humana y el medio ambiente frente al riesgo que puede conllevar la fabricación, comercialización y uso de las sustancias y mezclas químicas. Así, en este Reglamento se recogen las obligaciones de los fabricantes, de los importadores y de los usuarios intermedios pertenecientes a la industria cosmética [2].

Fue debido a este Reglamento que en 2006 se creó una agencia de la Unión Europea para gestionar y ejecutar los aspectos científicos, técnicos y administrativos del REACH. Se denominó Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos (ECHA) y recopila y actualiza de forma constante datos toxicológicos de distintos ingredientes químicos que pueden consultarse de forma pública e incluirse dentro de la evaluación de seguridad que elaboren los laboratorios [7].

Real Decreto 209/2005

Se elaboró y entró en vigor en 2005 a raíz de la Directiva 76/768/CEE del Consejo Europeo, introduciendo en el ordenamiento jurídico español las nuevas disposiciones de la Unión Europea para la regulación de los productos cosméticos. En él se describe la prohibición de la realización de experimentos toxicológicos con animales en los que se pruebe cualquier producto cosmético [3].

Norma ISO 11930

ISO (Organización Internacional de Normalización) es una federación mundial de organismos nacionales de normalización que elaboran normas internacionales destinadas a regular la evaluación global de la protección antimicrobiana de un producto cosmético [4]. Esta norma define un método de referencia del ensayo de eficacia de la conservación (Challenge Test), junto con los criterios de evaluación.

Expediente de Seguridad de un producto cosmético

Así, siguiendo el Reglamento 1223/2009, *“los productos cosméticos deben ser seguros en condiciones de utilización normales o razonablemente previsibles. En especial, un razonamiento basado en el balance entre riesgos y beneficios no debe servir como justificación de un riesgo para la salud humana”* [1].

Para ello, según el Artículo 3 de este mismo Reglamento, que versa sobre la seguridad, se debe tener en cuenta la presentación del producto, su etiquetado, sus instrucciones de uso y cualquier otra indicación o información proporcionada por la persona responsable de la puesta en el mercado. Ésta debe desarrollar un Expediente de Seguridad sobre el producto cosmético antes de su comercialización y ponerlo a disposición de la autoridad competente del estado miembro. Debe realizarlo una persona en disposición de un diploma universitario u otro título de cualificaciones oficiales de estudio teórico y práctico de farmacia, toxicología, medicina o disciplina similar reconocido por el estado miembro donde se elabora.

El **Expediente de Seguridad**, que debe estar actualizado permanentemente, ha de contener una serie de elementos primordiales: la **descripción del producto**, una **descripción del método de fabricación** acorde con las buenas prácticas de fabricación (BPF), **información sobre los experimentos en animales** que se hayan realizado anteriormente al 2013 –sobre el desarrollo o evaluación de seguridad del producto en sí o sus ingredientes–, **pruebas que demuestren el efecto reivindicado o claims** (cuando la naturaleza o efecto del producto las requieran) y, por último, **una evaluación o informe sobre la seguridad** del producto cosmético, descrito en el Artículo 10 y en el Anexo I del Reglamento 1223/2009. Éste último es el elemento más importante del Expediente de Seguridad.

La **descripción del producto** debe indicar en qué forma cosmética está (gel, crema, etc), qué función tiene, además de la fórmula cuali-cuantitativa del producto, su referencia, fabricante y etiquetado, entre otros aspectos.

Para poder **reivindicar un efecto** de un cosmético, en el expediente debe aparecer lo reivindicado junto con la justificación de las alegaciones publicitarias mediante estudios de eficacia realizados sobre los ingredientes y/o el producto acabado o bien mediante bibliografía relevante que los respalde.

En relación con la **evaluación de seguridad**, el responsable de la puesta en el mercado ha de velar por la seguridad del producto cosmético. Para ello, el cosmético tendrá que ser sometido a una serie de pruebas basándose en la información sobre su uso previsto y la exposición sistémica de los ingredientes descritos en su formulación final. Así, este expediente cosmético posee dos partes: la primera contendrá los datos relativos a la seguridad necesarios para la evaluación del producto, y la segunda contendrá la evaluación de la seguridad propiamente dicha, firmada por el evaluador. Éste debe, asimismo, velar porque esta evaluación se actualice aún cuando el producto ya se haya introducido en el mercado.

Además, según la directiva actual [1,4], los nuevos cosméticos lanzados al mercado deben previamente evaluarse mediante métodos científicos reconocidos por los reguladores, como el **Challenge Test**, para demostrar la eficacia del conservante frente a diferentes microorganismos. El conjunto de microorganismos está relacionado con contaminaciones que pueden darse en el proceso de elaboración y almacenamiento de los productos, así como en la manipulación por parte de los consumidores.

Expediente de Seguridad del producto cosmético: “Champú Preventivo Junior RF”

Este proyecto se centra en la realización del Expediente de Seguridad de un producto cosmético, “Champú Preventivo Junior RF”, principalmente en dos elementos fundamentales: la evaluación de seguridad y el test de eficacia de la conservación (Challenge Test).

Descripción del producto

La descripción comprende una serie de datos obligatorios, como son la marca del producto (“Champú Preventivo Junior RF”), su función (limpieza del cabello), referencia (Código Nacional del producto: 156986.8), responsable de la puesta en el mercado (Rueda Farma) y presentaciones (envase de 300 ml), así como la **composición cuali-cuantitativa** del producto. Es uno de los elementos más importantes en el expediente y debe detallar la identidad química de los ingredientes utilizados, que aparecerán –ordenados de mayor a menor porcentaje en función de su presencia en el producto final- en el etiquetado del producto en formato INCI (“*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*”), así como los números de registro (CAS: “*Chemical Abstracts Service*”, de origen americano, y/o EINECS: “*European Inventory of Existing Chemical Substances*”, de origen europeo), su función y su porcentaje específico en el producto final (Tabla 1). En la descripción también deben incluirse las advertencias de uso dispuestas en el etiquetado, así como su caducidad y periodo después de abierto a través del PAO (*Period After Opening*), que identifica el periodo de vida útil de un producto cosmético desde que se abre su envase por primera vez. La AFSSAPS (Agencia Francesa de Salud) ha publicado una guía del método para calcular el PAO teórico, que consiste en la evaluación de cinco parámetros: formulación, tipo de acondicionamiento, duración del producto, zona de aplicación y población a la que va destinado. El PAO práctico se calcula a partir del test de estabilidad del producto [6].

| Materia prima | Ingredientes (INCI) | % en Mat. Prima | Ing. | C (% en ingr.) | Función | Números CAS | Números EINECS |
|---------------|---------------------------------|-----------------|------|----------------|--|-------------------------------------|----------------|
| TEA TREE OIL | MELALEUCA ALTERNIFOLIA LEAF OIL | 0,5% | 100% | 0,5% | ANTIOXIDANTE / PERFUME / ANTIMICROBIANO / PEDICULICIDA / ANTIVIRAL | 85085-48-9 / 8022-72-8 / 68647-73-4 | 285-377-1 |

Tabla 1: Parte de la Tabla sobre la Composición cuali-cuantitativa del “Champú Preventivo Junior RF” que corresponde con el ingrediente *Melaleuca Alternifolia Leaf Oil*.

Evaluación de la seguridad

Es el elemento más importante en el Expediente de Seguridad que, de forma obligatoria, deben presentar todos los responsables de productos cosméticos. Es el razonamiento en el que, de forma clara, deben quedar recogidos los posibles riesgos por la exposición de los ingredientes del producto cosmético por separado y del producto cosmético final [1,6]. Se elabora a partir de una evaluación toxicológica que comprende un estudio bibliográfico sobre ensayos toxicológicos con los ingredientes químicos que componen el producto. Estos ensayos deben ser tanto *in vitro* como *in vivo* o clínicos, siempre que se dispongan. Los estudios *in vitro* se realizan anteriormente a los estudios *in vivo* y en humanos; algunos de

ellos son: test de corrosión dérmica, test de mutagenicidad y genotoxicidad –siendo el más conocido el test de Ames–, test de aberración cromosómica y test de fototoxicidad. Con todos ellos se obtiene información sobre la irritación y toxicidad de los ingredientes, imprescindibles a la hora de evaluar la seguridad de los mismos en los productos. A su vez, los estudios *in vivo* se utilizan para probar la respuesta fisiológica a un compuesto químico en animales cuando se administra por rutas de exposición tales como dermal, oral e inhalatoria. Este tipo de estudios permiten medir el NOAEL (*No-Observed Adversed Effect Levels*). Algunos de los estudios más utilizados son: Patch Test, Fotopatch Test, test de Draize y test de comedogenicidad [6].

La evaluación sobre la seguridad del producto cosmético está formada por tres aspectos fundamentales. En primer lugar, el resumen de la evaluación de riesgo, que se encuentra basada en efectos locales y sistémicos de todas las sustancias. En segundo lugar, de una evaluación adicional sobre la seguridad del producto terminado. Esta evaluación puede realizarse a partir de la información derivada de la Vigilancia de Mercado, notificando si se ha producido algún caso de reacción alérgica o efectos adversos. Y, en tercer lugar, de otros factores que puedan influir en la evaluación de seguridad, tales como la estabilidad o la resistencia microbiológica.

La **exposición** del cosmético se establece al cuantificar la cantidad de producto que, de forma esperada y siguiendo las normas de utilización, se pondrá en contacto con las partes externas del cuerpo humano. Así, se determina el SED (*Systemic Exposure Dosis*) del producto terminado y de cada uno de los ingredientes que lo conforman (Tabla 2). Para calcular este dato ha de tenerse en cuenta la superficie y región de aplicación, la cantidad de producto aplicado, la duración y la frecuencia de uso. Además, debe tenerse en cuenta el peso molecular de cada ingrediente, puesto que si es inferior a 500 Dalton se considera que la piel puede absorber el compuesto químico y, por tanto, llegar más fácilmente al torrente sanguíneo. Todos estos datos los aporta el Comité Científico de Seguridad de los Consumidores (en inglés, SCCS: *Scientific Committee on Consumer Safety*) [8].

| Ing. (INCI) | C (% ing.) | Aplic. diaria estimada (gr) | A (Expos. Relativa diaria) (mg/kg bw/day) | R Factor retención | %DA _p (% Ab. Dérmica) | MW (>500 D) | Log Pow | Correc %DA _p | SED _{INGR} | S (Sup. Exp. cm ²) | Frec. Apli. (al día) |
|---------------------------------|------------|-----------------------------|---|--------------------|----------------------------------|-------------|---------|-------------------------|---------------------|--------------------------------|----------------------|
| MELALEUCA ALTERNIFOLIA LEAF OIL | 0,5% | 10,46 | 1,51 | 0,01 | 100% | NO DATA | NO DATA | 100% | 0,0000755 | 1440 | 1 |

Tabla 2: Parte de la Tabla sobre el Cálculo de los valores de Exposición que se refiere al ingrediente *Melaleuca Alternifolia Leaf Oil* del “Champú Preventivo Junior RF”.

Al realizar el **perfil toxicológico** del producto, debe incluirse toda la información toxicológica relevante obtenida de los test *in vitro*, *in vivo* y de estudios clínicos realizados en cada uno de los ingredientes presentes en la fórmula. Los datos más a tener en cuenta son la toxicidad aguda (DL50) por rutas de exposición relevantes (principalmente dérmica, en este caso), de irritación en animales y en humanos (casos de irritación dérmica u ocular), el grado de sensibilización dérmica, el grado de absorción a través de la dermis, la toxicidad por dosis repetida, la toxicocinética, fototoxicidad, carcinogénesis y mutagénesis (Tabla 3). En este último caso, aquellos ingredientes descritos como CMR (*Carcinogenic, Mutagenic, toxic to Reproduction*) de categoría 1 ó 2 no pueden incluirse en los productos cosméticos según el Reglamento actual [1].

| Ingred. (INCI) | Irrit. dérmica | NOAEL | Sensibiliz. | CMR | DNEL | DL50 | OTROS DATOS TOXICOLÓGICOS |
|---------------------------------|---------------------|------------------|--------------------------|---------|---------|--------------------|---|
| MELALEUCA ALTERNIFOLIA LEAF OIL | NO IRRITANTE | 117 mg/bw kg/day | NO SENSIBILIZANTE | NO DATA | NO DATA | >5000 mg/bw kg/day | Leve Irritante Ocular (Test Het Cam), No Mutagénico (Test Ames), No Teratogénico. En humanos: bajo potencial sensibilizante e irritante (Inf. Proveedor). <i>In vitro</i> (absorción epidérmica): solo los componentes terpinel-4-ol y α -terpineol son absorbidos, sin potenciales efectos adversos. Monografía del CE (Consejo de Europa, 2001): productos con >5% pueden causar reacciones en la piel. Considerados seguros los que contienen un 2-3% (HSDB, Review of tea tree) . |

Tabla 3: Parte de la Tabla del Perfil toxicológico de los ingredientes que se corresponde con el ingrediente *Melaleuca Alternifolia Leaf Oil*, incluido en el Expediente del “Champú Preventivo Junior RF”.

En este apartado, se debe realizar además una **evaluación del Margen de Seguridad** (denominado “MoS”). En él, para cada uno de los ingredientes, en función del SED y del NOAEL, se evalúa su seguridad toxicológica. Se realiza mediante una sencilla fórmula: $MoS = NOAEL/SED$. Cuando el valor obtenido es superior a 100, desde el punto de vista toxicológico el ingrediente en cuestión es considerado como seguro. En el caso del “Champú Preventivo Junior RF”, ninguno de los ingredientes incluidos en la fórmula posee un valor MoS inferior a 100, por lo que se consideran seguros, como es el caso del ingrediente *Melaleuca Alternifolia Leaf Oil* (Tabla 4).

| Materia prima | Ingredientes (INCI) | NOAEL (mg/bw kg/day) | SED _{INGR} | Mos (NOAEL/SED) | Evaluación |
|---------------|---------------------------------|----------------------|---------------------|--------------------|------------------|
| TEA TREE OIL | MELALEUCA ALTERNIFOLIA LEAF OIL | 117 | 0,0000755 | 1549668,874 | ES SEGURO |

Tabla 4: Extracto de la Tabla de la Evaluación del Margen de Seguridad que se refiere al ingrediente *Melaleuca Alternifolia Leaf Oil* en el Champú Preventivo Junior RF.

Test de eficacia de la conservación: Challenge Test

Los cosméticos necesitan conservantes, ingredientes capaces de controlar la carga microbiana durante el tiempo de uso del producto y dentro del plazo de tiempo de vida útil [13]. Siguiendo las directrices de la legislación europea e internacional [1,4], referida a la normalización de los productos cosméticos, los laboratorios deben demostrar la resistencia a la contaminación microbiológica de los conservantes de los cosméticos mediante estudios como el Challenge Test. Sin embargo, este ensayo no se requiere para aquellos productos cuyo riesgo microbiológico se ha demostrado que es bajo o en los que es difícil que se produzca crecimiento microbiológico, como es el caso de los aceites.

De esta prueba se deduce que el producto está adecuadamente conservado y que se espera, durante su uso en condiciones normales o razonablemente previsibles, una apropiada eficacia del conservante a la contaminación microbiológica, durante la vida útil del cosmético.

Preparación de los componentes del ensayo

Las especificaciones generales y las instrucciones técnicas se dan en la Norma ISO 11930 y 21148 [4,12]. En primer lugar, se han de preparar los componentes que se utilizarán en el ensayo: diluyente, neutralizante y suspensiones microbiológicas.

El diluyente está compuesto por: digerido pancreático de caseína (1,0 g), cloruro sódico (8,5 g) y agua (1000 ml), que son mezclados y esterilizados, debiendo ser el pH posterior de $7,0 \pm 0,2$ (a temperatura ambiente). Se ha de preparar también el neutralizante, cuya función es la de inhibir la acción del conservante principal presente en la formulación cosmética. Aunque hay otros neutralizantes adecuados (ver Material Complementario), la Norma ISO 11930 recomienda el neutralizante Caldo líquido Eugon LT 100, un medio con ingredientes (lecitina y polisorbato 80) que neutralizan los conservantes del producto cosmético.

Además de estos dos componentes, se deben preparar las suspensiones de los microorganismos que van a utilizarse en el ensayo: suspensiones bacterianas (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), suspensiones de *Candida albicans* ATCC 10231 y suspensiones de esporas de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

De esta forma, a partir del medio de cultivo madre para bacterias –agar de tripton y soja (TSA)- así como del medio para *Candida albicans* –agar de Sabouraud dextrosa (SDA)-, se prepara un subcultivo mediante siembra en estría en placa y se incuba ($32,5 \pm 2,5$) °C durante 18 a 24 h. A partir de éste se prepara un segundo subcultivo con el mismo tratamiento, y de éste se prepara un tercero; estos dos últimos constituyen el cultivo del ensayo. Se toman 10 ml de diluyente y se suspenden las asas de las células recogidas de los diferentes medios, ajustando finalmente el número de células de la suspensión de 1×10^7 ufc/ml a 1×10^8 ufc/ml para bacterias y de 1×10^6 ufc/ml a 1×10^7 ufc/ml para *C. albicans*, usando el diluyente para ello. Este es el denominado **inóculo estandarizado**.

Asimismo, a partir del medio de agar con patata y dextrosa (PDA) para *Aspergillus brasiliensis*, se prepara una suspensión en el diluyente y se obtiene un cultivo confluyente que se incuba ($22,5 \pm 2,5$) °C durante 7 a 11 días. Tras la incubación, se desprenden las esporas de la superficie de cultivo con una solución de polisorbato, transfiriendo la suspensión a un recipiente que se filtra. Se realiza un examen al microscopio y se ajusta el número de esporas en suspensión a un valor aproximado de 1×10^6 esporas/ml a 1×10^7 esporas/ml, lo que constituiría el llamado **inóculo estandarizado**.

Ensayo de la eficacia del neutralizante

Una vez se tienen todos los elementos necesarios para el ensayo, se debe verificar la capacidad del neutralizante de inhibir la actividad antimicrobiana de la formulación cosmética sin inhibir los microorganismos del ensayo.

Para ello, se realiza un ensayo por separado para cada cepa. Cada ensayo debe tener tres tipos de mezclas. La primera estará formada por 1 ml de una suspensión estandarizada que contenga alrededor de 10^3 ufc/ml (para cada microorganismo), una mezcla de 9 ml de neutralizante y 1 ml de la fórmula cosmética (en nuestro caso, 1 ml de “Champú Preventivo Junior RF”); esta se denominará **mezcla ensayo**. Si al final del ensayo el neutralizante resulta ser ineficaz, es en este paso donde debe efectuarse una segunda dilución decimal. Este dato es importante para los cálculos de los resultados del Challenge Test.

La segunda mezcla contendrá: 1 ml de una suspensión estandarizada que contenga alrededor de 10^3 ufc/ml (para cada microorganismo), 9 ml de neutralizante y 1 ml de diluyente; esta se denomina **mezcla control**.

En tercer lugar, se ha de preparar la **mezcla inóculo control**, compuesta por 1 ml de una suspensión estandarizada que contenga alrededor de 10^3 ufc/ml (para cada microorganismo) y 10 ml de diluyente.

El volumen final de todos los tubos es de 11 ml y cada condición se hace por duplicado.

Posteriormente, se añade 1 ml de cada mezcla (“ensayo”, “control” e “inóculo control”) al medio de agar apropiado (TSA en el caso de las bacterias, SDA para *C. albicans* y PDA para *A. brasiliensis*), se incuban los medios a $(32,5 \pm 2,5)$ °C durante 48 a 72 h (bacterias y *C. albicans*) y a $(22,5 \pm 2,5)$ °C durante 3 a 5 días (para *A. brasiliensis*).

A continuación, debe calcularse el número de microorganismos en unidades formadoras de colonias por mililitro que se hallan en el “inóculo control” (N_v), que debe ser aproximadamente 100, así como el de la mezcla “ensayo” (N_{vf}) y la mezcla “control” (N_{vn}).

La eficacia del neutralizante se demuestra si $N_{vf} \geq 0,5 N_{vn}$ y si N_{vn} se aproxima a N_v , ya que si no fueran valores próximos, se consideraría al neutralizante tóxico para los microorganismos. Si el test cumple estos criterios, el cosmético, con el conservante inhibido, es sensible a la contaminación microbiana y se realiza el siguiente ensayo del Challenge Test, para determinar la eficacia del conservante. Si el test resultase negativo, el cosmético se consideraría “no sensible a la contaminación” por estas cepas microbianas.

Ensayo de la eficacia de la conservación de la fórmula cosmética

Una vez se ha demostrado la eficacia del neutralizante, se debe certificar la eficacia de la conservación de la fórmula cosmética, en este caso, el “Champú Preventivo Junior RF”.

El conservante en este producto se compone de la mezcla de *Methylchloroisothiazolinone* y *Methylisothiazolinone*, conocida comercialmente con el nombre de *Kathon*, un sustituto de los cada vez menos frecuentes parabenos. En el Reglamento 1223/2009 se concluye que la mezcla de estos dos conservantes no constituye riesgo alguno para la salud cuando se utiliza en productos que se aclaran (como los jabones, champús, etc.) a una concentración máxima de 0,0015%. El porcentaje en el “Champú Preventivo Junior RF” es inferior, por lo que cumple con la normativa y no supone ningún riesgo.

Se realiza el ensayo para cada cepa por separado. Para cada cepa se dispensan 20 ml del “Champú Preventivo Junior RF” en un recipiente y se añade a éste 0,2 ml del inóculo estandarizado para obtener 1×10^5 ufc/ml a 1×10^6 ufc/ml para bacterias y entre 1×10^4 ufc/ml y 1×10^5 ufc/ml para *C. albicans* y *A. brasiliensis*, mezclando hasta homogeneizar. Esta es la concentración inicial de microorganismos presentes en el producto (N_0).

Se incuban los recipientes con la mezcla de fórmula cosmética más inoculación y se mantienen a $(32,5 \pm 2,5)$ °C para bacterias y *C. albicans* y a $(22,5 \pm 2,5)$ °C para *A. brasiliensis*. Para cada cepa, se toma 1 ml de la mezcla a los tiempos especificados: 7 días (T7), 14 días (T14) y 28 días (T28). Esta muestra de 1 ml se transfiere a 9 ml de neutralizante y se mezcla, dejando reposar durante (30 ± 15) minutos a temperatura ambiente. A partir de la dilución 1/10, se realizan tres diluciones decimales sucesivas en el diluyente para facilitar el recuento de los microorganismos supervivientes, que se lleva a cabo en un medio de agar adecuado a cada cepa y por duplicado.

Se determina así la media del número de microorganismos presentes en la muestra en el tiempo t_0 ($N_0 = N/100$), que debe estar entre 1×10^5 ufc/ml y 1×10^6 ufc/ml para bacterias y entre 1×10^4 ufc/ml y 1×10^5 ufc/ml para *C. albicans* y *A. brasiliensis*, y el número de microorganismos supervivientes en cada tiempo de muestreo (N_x : N_{T7} , N_{T14} , N_{T28}), utilizando la ecuación: $N_x = C / (V \times d)$, siendo “C” la media del número de colonias contadas por duplicado en las placas, “V” el volumen de inóculo depositado en cada placa en mililitros (1 ml) y “d” el factor de dilución correspondiente a la dilución tomada en el recuento.

Para obtener los valores de reducción de la presencia microbiana que se obtienen en cada tiempo de muestreo, R_x , se utiliza la ecuación: $R_x = \log N_0 - \log N_x$. Puede no haber reducción e incluso puede haber un incremento.

Para que el resultado se considere correcto y, por tanto, quede probada la capacidad de protección del sistema conservante de la fórmula cosmética, deben cumplirse los criterios recogidos en la Norma ISO 11930 (ver Material Complementario): el **criterio A**, por el que se considera al producto cosmético protegido contra la proliferación microbiana, y/o el **criterio B**, por el que se considera protegido teniendo en cuenta factores de control adicionales no relacionados con la formulación.

Resultados

En el caso del “Champú Preventivo Junior RF”, los resultados obtenidos en el ensayo de la eficacia del neutralizante son los recogidos en la Tabla 5. En todos los casos, se cumple que $N_{vf} \geq 0,5 N_{vn}$ y que N_{vn} se aproxima a N_v , por lo que el test de eficacia del neutralizante ha resultado positivo y podemos concluir que la capacidad inhibitoria del neutralizante es la adecuada.

| Nº m.o. (ufc/ml) | <i>E. coli</i> | | <i>S. aureus</i> | | <i>P. aeruginosa</i> | | <i>C. albicans</i> | | <i>A. brasiliensis</i> | |
|------------------------|----------------|-------|------------------|-------|----------------------|-------|--------------------|-------|------------------------|-------|
| | Dupl. | Media | Dupl. | Media | Dupl. | Media | Dupl. | Media | Dupl. | Media |
| N_{vf} | 52 | 50.5 | 50 | 51.5 | 47 | 49 | 52 | 51 | 51 | 50 |
| | 49 | | 53 | | 51 | | 50 | | 49 | |
| N_{vn} | 98 | 95 | 99 | 101.5 | 102 | 101 | 103 | 100.5 | 97 | 98 |
| | 92 | | 104 | | 100 | | 98 | | 99 | |
| N_v | 99 | 98 | 100 | 99 | 96 | 98.5 | 100 | 102 | 95 | 96.5 |
| | 97 | | 98 | | 101 | | 104 | | 98 | |

Tabla 5: Tabla que recoge los resultados del recuento de número de microorganismos por unidades formadoras de colonias en 1 ml en el ensayo de la eficacia del neutralizante Caldo líquido Eugon LT 100.

Respecto al ensayo de la eficacia del conservante, los resultados obtenidos para el “Champú Preventivo Junior RF” son los recogidos en la Tabla 6.

| Nº m.o. (ufc/ml) | <i>E. coli</i> | | <i>S. aureus</i> | | <i>P. aeruginosa</i> | | <i>C. albicans</i> | | <i>A. brasiliensis</i> | |
|------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|--------------------|--------------------|------------------------|-------------------|
| | Dupl. | Media | Dupl. | Media | Dupl. | Media | Dupl. | Media | Dupl. | Media |
| Basal o N_0 | 1.1×10^6 | 1.05×10^6 | 9.0×10^5 | 9.6×10^5 | 1.4×10^6 | 1.2×10^6 | 1.0×10^4 | 1.15×10^4 | 1.0×10^4 | 1.1×10^4 |
| | 1.0×10^6 | | 1.2×10^6 | | 1.0×10^6 | | 1.3×10^4 | | 1.2×10^4 | |
| N_{T7} | 30 | 25 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| | 20 | | <10 | | <10 | | <10 | | <10 | |
| N_{T14} | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| | <10 | | <10 | | <10 | | <10 | | <10 | |
| N_{T28} | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 | <10 |
| | <10 | | <10 | | <10 | | <10 | | <10 | |

Tabla 6: Tabla que recoge los resultados del recuento de número de microorganismos por unidades formadoras de colonias en 1 ml a distintos tiempos (0 o basal, 7, 14 y 28 días desde la inoculación) en el ensayo de la eficacia del conservante del “Champú Preventivo Junior RF”.

Por tanto, tal y como recoge la Tabla 7, para bacterias, se han cumplido tanto los criterios A como B de reducción de la presencia microbiana que especifica la Norma ISO 11930 [4] (ver Material Complementario), y el test de eficacia se considera positivo. Los resultados para *Candida albicans* cumplen también los criterios A y B, como en el caso de *Aspergillus brasiliensis*, por lo que el test ha resultado positivo.

| Tiempo de muestreo | Valores obtenidos de reducción logarítmica ($R_x = \log N_0 - \log N_x$) | | | | |
|--------------------|--|------------------|----------------------|--------------------|------------------------|
| | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> | <i>A. brasiliensis</i> |
| T7 | 4.62 | 4.98 | 5.08 | 3.06 | 3.04 |
| T14 | 5.02 | 4.98 | 5.08 | 3.06 | 3.04 |
| T28 | 5.02 | 4.98 | 5.08 | 3.06 | 3.04 |

Tabla 7: Tabla que recoge los valores de reducción de la presencia microbiana que se obtienen en cada tiempo de muestreo (7, 14 y 28 días desde la inoculación) en el ensayo de la eficacia del conservante del “Champú Preventivo Junior RF”.

Conclusión

Siguiendo las directrices de la legislación vigente, se ha realizado la evaluación de seguridad sobre el producto cosmético “Champú Preventivo Junior RF”. En él, se presentan los apartados más importantes por los cuales se concluye que el producto cosmético es seguro y no supone riesgo para el consumidor.

Además, se presentan los resultados del test de eficacia de la conservación del “Champú Preventivo Junior RF”. El Challenge Test realizado cumple con los criterios de aceptación frente a los patógenos analizados, por lo que se considera probada la eficacia del sistema conservante del producto y su resistencia microbiológica; el producto cosmético está protegido contra la proliferación microbiana.

Referencias

1. Reglamento (CE) N° 1223/2009 de 30 de noviembre de 2009. Del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea. En Diario Oficial de la Unión Europea, núm. 342, p. 59.
2. Reglamento (CE) N° 1907/2006 de 18 de diciembre de 2006. Del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea. En Diario Oficial de la Unión Europea, núm. 396, p. 1.
3. Real Decreto 209/2005 de 25 de febrero de 2005. Del Ministerio de Sanidad y Consumo de España. BOE, núm. 49, p. 7121.
4. AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación (2013). Cosméticos. Microbiología. Ensayo de la protección antimicrobiana de un producto cosmético. Norma ISO 11930.
5. Moreno, M. (2013). Evaluación de la seguridad y expediente de información del product. Base legal Reglamento 1223/2009. Jornada Informativa sobre la Evaluación de la Seguridad de los Productos Cosméticos.
6. López, A., Louzán, T.M. & González, S. (2013). Evaluación de la seguridad y expediente de información del producto cosmético. Dianas. 2(2).
7. Búsqueda de productos químicos (7 Abril). In ECHA, European Chemical Agency. <http://echa.europa.eu/es/>
8. Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) (2012). The SCCS’S notes of Guidance for the testing of cosmetic substances and their safety evaluation. Notes of Guidance: SCCS/1501/12.
9. Carson, C.F. & Riley, T.V. (2001). Safety, efficacy and provenance of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. Contact Dermatitis. 45(2), pp: 65-67.
10. European Commission’s Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) (2008). Opinion on Tea tree oil. Núm, SCCP/1155/08.
11. Tea tree oil (15 Abril). In Toxnet, Toxicology Data Network. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+8193>
12. AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación (2010). Cosméticos. Microbiología. Instrucciones generales para el examen microbiológico. Norma ISO 21148.
13. Mosquera, T. (2014). Estudio comparativo de la eficiencia antibacteriana de una mezcla de parabenos frente al aceite de romero (*Rosmarinus officinalis* Lamiaceae) utilizados como conservantes en una formulación cosmética. Tesis previa a la obtención del título de Magister en Ciencias y Tecnologías Cosméticas. Universidad Politécnica Salesiana. Unidad de Postgrado.
14. CPNP (7 Abril). In CPNP, Cosmetic Products Notification Portal. <https://webgate.ec.europa.eu/cnpn/public/tutorial.cfm>

MATERIAL COMPLEMENTARIO:

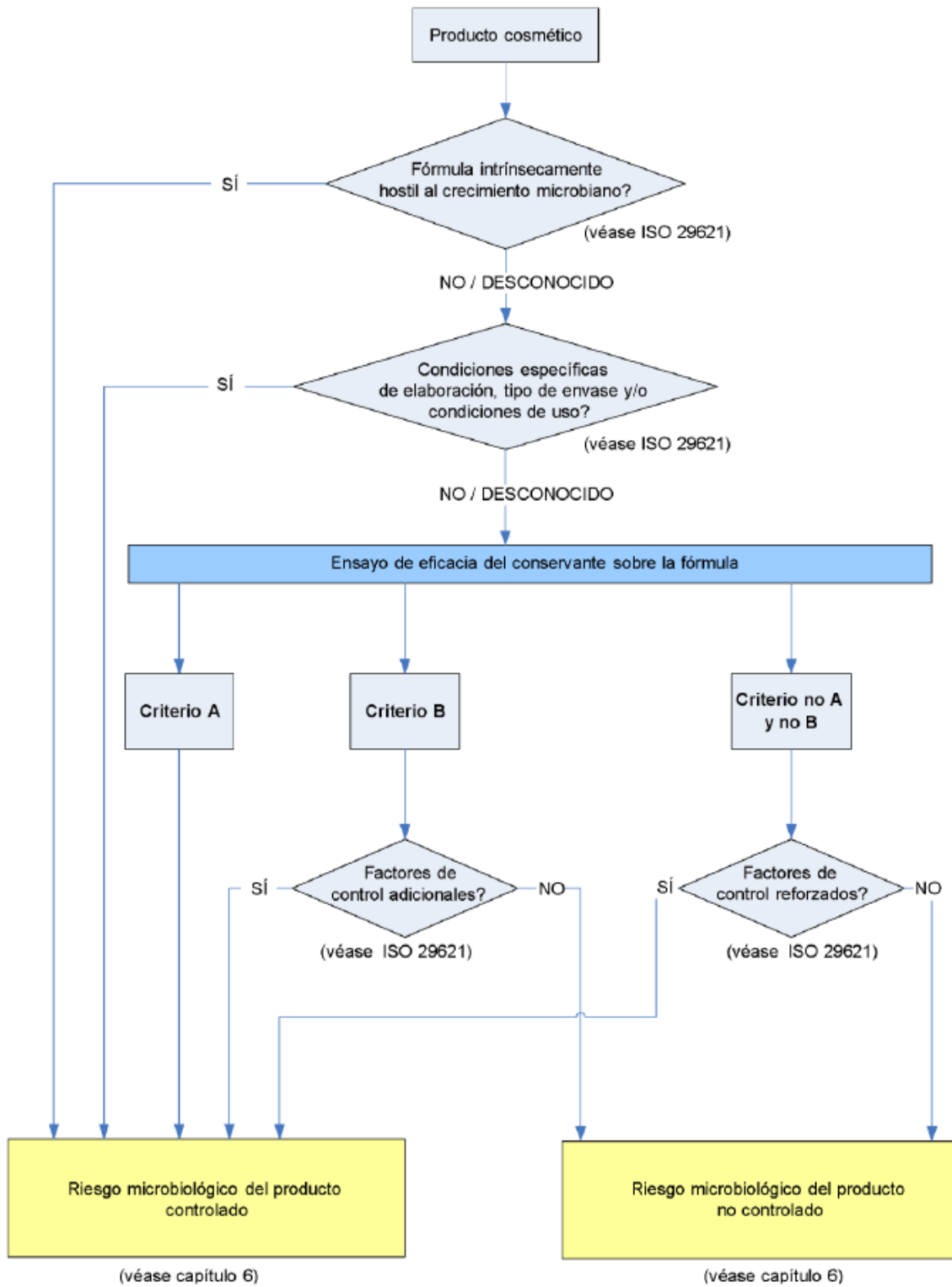


Diagrama de decisión para valorar el riesgo microbiológico de un producto cosmético, extraída del Anexo A de la Norma ISO 11930.

Ejemplos de neutralizantes de la actividad antimicrobiana, de conservantes y líquidos de lavado

Tabla C.1 – Ejemplos de neutralizantes de la actividad antimicrobiana, de conservantes y líquidos de lavado

| Conservantes | Compuestos químicos capaces de neutralizar la actividad antimicrobiana de los conservantes | Neutralizantes adecuados y líquidos de lavado (para los métodos de filtración a través de membrana) |
|---|--|---|
| Compuestos fenólicos: Parabenos, fenoxietanol, feniletanol, etc. Anilidas | Lecitina Polisorbato 80 Óxido de etileno condensado en alcohol graso Tensioactivos no iónicos | Polisorbato 80, 30 g/l + lecitina, 3 g/l Óxido de etileno condensado en alcohol graso, 7 g/l + lecitina, 20 g/l + polisorbato 80, 4 g/l Caldo neutralizante D/E ^a , caldo SDCLP ^b Líquido de lavado: agua destilada; triptona 1 g/l + NaCl, 9 g/l; polisorbato 80, 5 g/l |
| Compuestos de amonio cuaternario Tensioactivos catiónicos | Lecitina, saponina, polisorbato 80, dodecil sulfato sódico Óxido de etileno condensado en alcohol graso | Polisorbato 80, 30 g/l + dodecil sulfato sódico, 4 g/l + lecitina, 3 g/l Polisorbato 80, 30 g/l + saponina, 30 g/l + lecitina, 3 g/l Caldo neutralizante D/E ^a , caldo SDCLP ^b Líquido de lavado: agua destilada; triptona 1 g/l + NaCl, 9 g/l; polisorbato 80, 5 g/l |
| Aldehídos Agentes liberadores de formaldehído | Glicina, histidina | Lecitina, 3 g/l + polisorbato 80, 30 g/l + L-histidina, 1 g/l Polisorbato 80, 30 g/l + saponina, 30 g/l + L-histidina, 1 g/l + L-cisteína, 1 g/l Caldo neutralizante D/E ^a , caldo SDCLP ^b Líquido de lavado: polisorbato 80, 3 g/l + L-histidina, 0,5 g/l |
| Compuestos oxidantes | Tiosulfato sódico | Tiosulfato sódico, 5 g/l Líquido de lavado: tiosulfato sódico, 3 g/l |
| Isotiazolinonas, Imidazoles | Lecitina, saponina, Aminas, sulfatos, mercaptanos, bisulfito sódico, tioglicolato sódico. | Polisorbato 80, 30 g/l + saponina, 30 g/l + lecitina, 3 g/l Líquido de lavado: triptona, 1 g/l + NaCl, 9 g/l; polisorbato 80, 5 g/l |
| Biguanidas | Lecitina, saponina, polisorbato 80 | Polisorbato 80, 30 g/l + saponina, 30 g/l + lecitina, 3 g/l Líquido de lavado: triptona, 1 g/l + NaCl, 9 g/l; polisorbato 80, 5 g/l |
| Sales metálicas (Cu, Zn, Hg) Compuestos orgánicos de mercurio | Bisulfito de sodio, L-cisteína Compuestos sulfidrilos, ácido tioglicólico | Tioglicolato sódico, 0,5 g/l o 5 g/l L-cisteína, 0,8 g/l o 1,5 g/l Caldo neutralizante D/E ^a , caldo SDCLP ^b Líquido de lavado: tioglicolato sódico, 0,5 g/l |

^a Caldo neutralizante Dey/Engley.
^b Caldo de caseína y soja digeridas con lecitina y polisorbato 80.

Tabla que recoge los ejemplos de neutralizantes de la actividad antimicrobiana, extraída del Anexo C de la Norma ISO 11930.

Tabla B.1 – Criterios de evaluación

| Microorganismos | Valores requeridos de reducción logarítmica ($R_x = \lg N_0 - \lg N_x$) ^a | | | | | | | |
|--------------------|--|--------------------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|------------------------|-------------|
| | Bacterias | | | <i>C. albicans</i> | | | <i>A. brasiliensis</i> | |
| Tiempo de muestreo | T7 | T14 | T28 | T7 | T14 | T28 | T14 | T28 |
| Criterio A | ≥ 3 | ≥ 3 y NI ^b | ≥ 3 y NI | ≥ 1 | ≥ 1 y NI | ≥ 1 y NI | ≥ 0 ^c | ≥ 1 y NI |
| Criterio B | No realizado | ≥ 3 | ≥ 3 y NI | No realizado | ≥ 1 | ≥ 1 y NI | ≥ 0 | ≥ 0 y NI |

^a En este ensayo se acepta un margen de desviación de 0,5 log (véase 5.7).
^b NI: no hay incremento en el recuento respecto al del tiempo de contacto precedente.
^c $R_x = 0$ cuando $\lg N_0 = \lg N_x$ (No hay incremento respecto al recuento inicial).

Tabla que recoge los Criterios de evaluación para el ensayo de eficacia de la conservación, extraída del Anexo B de la Norma ISO 11930.