

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

EVALUACIÓN *in vivo* DE LA CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE *Lactobacillus acidophilus* FRENTE A *Propionibacterium acnes* EN JÓVENES CON DIAGNÓSTICO PREVIO DE ACNÉ TIPO II, PARROQUIA DE ZÁMBIZA, DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO.

AUTOR:

VICTORIA SHEILA PUMISACHO OCAÑA

DIRECTORA:

TATIANA DE LOS ÁNGELES MOSQUERA TAYUPANTA

Quito, febrero del 2015

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, autorizo a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además, declaro que los conceptos desarrollados, análisis realizados y las conclusiones del presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad del autor.

Quito, febrero del 2015

Victoria Sheila Pumisacho Ocaña

C.I: 1721126587

DEDICATORIA

A Dios por el fortalecimiento y las bendiciones recibidas en mi vida.

A mi Familia, mis Padres por sus enseñanzas, esfuerzos, apoyo, educación y valores.

A mi compañera fiel mi hermana, por su apoyo incondicional y por las experiencias compartidas en todos los momentos de nuestras vidas.

Al amor de mi vida mi esposo Gustavo, que me dio la fortaleza, comprensión y apoyo, porque estuvo siempre a mi lado y me enseñó que no debo rendirme ante los tropiezos o equivocaciones y puedo dar lo mejor de mí.

A la luz de mi vida, mi hija Tábita, que me ha brindado su amor incondicional día a día, esto es por ti.

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de tesis la Ing. Tatiana Mosquera por su apoyo, dedicación, confianza y enseñanzas brindadas durante este tiempo, mi más sincero sentimiento de agradecimiento, admiración y respeto.

A todo el personal humano del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana, gracias por su apoyo y disponibilidad.

A la Dra. Marcela Paredes por colaborar con la evaluación dermatológica en el estudio de eficacia cosmética instrumental.

A María Elena Maldonado, PhD, por sus valiosos comentarios y asesoría.

A los estudiantes de Ing. en Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana que participaron en el Test de Irritabilidad, gracias por su colaboración.

A las autoridades y los estudiantes del Colegio Fernando Ortiz Crespo y de la Unidad Educativa Pedro Luis Calero que participaron en la Evaluación instrumental, gracias por su disponibilidad.

Y a todas y cada una de las personas que no nombré, que conocí en el transcurso del proceso y que me colaboraron en este camino brindándome siempre su apoyo y amabilidad.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO 1 | 2 |
| ANTECEDENTES | |
| 1.1 Planteamiento del problema..... | 2 |
| 1.2 Justificación..... | 3 |
| 1.3 Hipótesis..... | 4 |
| 1.4 Objetivos | 5 |
| 1.5 Variables..... | 5 |
| CAPÍTULO 2 | 7 |
| MARCO TEÓRICO | |
| 2.1 El acné..... | 7 |
| 2.2 Fisiología del acné..... | 7 |
| 2.2.1 <i>Propionibacterium acnes</i> | 8 |
| 2.3 Clasificación del acné..... | 9 |
| 2.4 Tratamientos para el acné..... | 9 |
| 2.4.1 Tópico..... | 10 |
| 2.4.2 Sistémico | 11 |
| 2.4.3 Bacterioterapia | 11 |
| 2.5 Microorganismos antagónicos..... | 12 |
| 2.6 Bacterias ácido lácticas (BAL)..... | 13 |
| 2.6.1 Características generales | 13 |
| 2.6.2 Importancia de las BAL | 14 |
| 2.6.2.1 Efecto inhibidor..... | 14 |
| 2.6.2.2 Potencial probiótico..... | 14 |

| | |
|---|-----------|
| 2.6.3 Características del género <i>Lactobacillus</i> | 15 |
| 2.6.3.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 16 |
| 2.7 Pruebas de actividad antagónica <i>in vitro</i> | 17 |
| 2.7.1 Método directo | 17 |
| 2.7.2 Método indirecto | 17 |
| 2.8 Lociones | 17 |
| 2.8.1 Control de calidad | 18 |
| 2.9 Seguridad cosmética..... | 18 |
| 2.9.1 Test de irritabilidad único | 19 |
| 2.10 Actividad cosmética <i>in vivo</i> | 20 |
| 2.10.1 Métodos de exploración no invasivos | 20 |
| 2.10.2 Visiopor ® PP 34 N..... | 21 |
| CAPÍTULO 3 | 22 |
| MARCO METODOLÓGICO | |
| 3.1 Lugar de investigación | 22 |
| 3.2 Determinación <i>in vitro</i> la concentración en la cual <i>L. acidophilus</i> ATCC® 4356 es antagonista de <i>P. acnes</i> ATCC®11827 | 22 |
| 3.2.1 Disposiciones generales de análisis..... | 22 |
| 3.2.2 Equipos..... | 27 |
| 3.2.3 Procedimiento..... | 28 |
| 3.2.4 Análisis estadístico..... | 30 |
| 3.3 Loción con <i>L. acidophilus</i> ATCC®4356 | 30 |
| 3.3.1 Disposiciones generales de análisis..... | 31 |
| 3.3.2 Equipos..... | 33 |
| 3.3.3 Procedimiento..... | 33 |

| | |
|---|----|
| 3.4 Evaluación <i>in vitro</i> el efecto antagónico de las lociones elaboradas a base de <i>L. acidophilus</i> ATCC® 4356 frente a <i>P. acnes</i> ATCC®11827 | 36 |
| 3.5 Evaluación de la inocuidad dérmica de la loción (test de irritabilidad) | 36 |
| 3.5.1 Disposiciones generales de análisis..... | 37 |
| 3.5.2 Procedimiento..... | 43 |
| 3.6 Evaluación de la actividad cosmética <i>in vivo</i> | 44 |
| 3.6.1 Disposiciones generales de análisis..... | 44 |
| 3.6.2 Equipos..... | 45 |
| 3.6.3 Procedimiento..... | 45 |
| CAPÍTULO 4 | 46 |
| RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS | |
| 4.1 Determinación <i>in vitro</i> de la concentración en la cual <i>L. acidophilus</i> ATCC® 4356 es antagonista de <i>P. acnes</i> ATCC®11827 | 46 |
| 4.1.1 Análisis estadístico de los halos de inhibición generados por <i>L. acidophilus</i> ATCC® 4356..... | 47 |
| 4.2 Evaluación <i>in vitro</i> el efecto antagónico de las lociones elaboradas con <i>L. acidophilus</i> ATCC® 4356 sobre <i>P. acnes</i> ATCC®11827. | 50 |
| 4.2.1 Análisis estadístico de los halos de inhibición generados por las lociones formuladas..... | 52 |
| 4.2.2 Control de calidad de la loción..... | 54 |
| 4.3 Test de irritabilidad de la loción..... | 55 |
| 4.4 Estudio de actividad cosmética instrumental | 57 |
| 4.4.1 Evaluación dermatológica..... | 57 |
| 4.4.2 Evaluación instrumental..... | 60 |
| CONCLUSIONES | 62 |

RECOMENDACIONES.....64
LISTA DE REFERENCIAS65

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>P. acnes</i> | 9 |
| Tabla 2. Tratamientos tópicos utilizados en el acné | 10 |
| Tabla 3. Tratamientos sistémicos utilizados en el acné | 11 |
| Tabla 4. Clasificación taxonómica de <i>L. acidophilus</i> | 16 |
| Tabla 5. Composición de agar MRS | 24 |
| Tabla 6. Composición del caldo MRS | 25 |
| Tabla 7. Composición del TSA..... | 26 |
| Tabla 8. Composición del TSB | 26 |
| Tabla 9. Equipos utilizados | 27 |
| Tabla 10. Información técnica de glicerina..... | 31 |
| Tabla 11. Información técnica de CMCS..... | 32 |
| Tabla 12. Equipos utilizados | 33 |
| Tabla 13. Diseño experimental factorial 2 x 2 | 34 |
| Tabla 14. Fórmula unitaria de la loción experimental A | 34 |
| Tabla 15. Fórmula unitaria de la loción experimental B..... | 34 |
| Tabla 16. Fórmula unitaria de la loción experimental C..... | 35 |
| Tabla 17. Fórmula unitaria de la loción experimental D | 35 |
| Tabla 18. Escala de evaluación de eritema para test de irritabilidad | 39 |
| Tabla 19. Escala de evaluación de edema para test de irritabilidad..... | 39 |
| Tabla 20. Escala de evaluación de ampollas para test de irritabilidad..... | 40 |
| Tabla 21. Escala de evaluación de descamación para test de irritabilidad..... | 40 |
| Tabla 22. Escala de evaluación de detergencia para test de irritabilidad..... | 41 |
| Tabla 23. Escala de evaluación de reflectividad para test de irritabilidad | 42 |
| Tabla 24. Clasificación del índice de irritación primaria cutánea..... | 43 |
| Tabla 25. Equipos utilizados | 45 |
| Tabla 26. Halos de inhibición <i>L. acidophilus</i> ATCC® 4356 frente a <i>P. acnes</i> ATCC®11827 | 46 |
| Tabla 27. Diámetro de halos de inhibición de la loción A frente a <i>P. acnes</i> ATCC®11827 | 50 |

| | |
|--|----|
| Tabla 28. Halos de inhibición la loción B frente a <i>P. acnes</i> ATCC®11827 | 50 |
| Tabla 29. Halos de inhibición la loción C frente a <i>P. acnes</i> ATCC®11827 | 51 |
| Tabla 30. Halos de inhibición la loción D frente a <i>P. acnes</i> ATCC®11827 | 51 |
| Tabla 31. Resultados del análisis organoléptico de la loción..... | 54 |
| Tabla 32. Resultados del análisis físico – químico de la loción A..... | 55 |
| Tabla 33. Datos obtenidos en el test de irritabilidad..... | 56 |
| Tabla 34. Índice de irritación primaria cutánea de la loción A. | 57 |
| Tabla 35. Porcentaje de disminución de porfirinas generadas por <i>P. acnes</i> después de la aplicación de la loción A..... | 60 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Diagrama de caja del diámetro de halos de inhibición vs la concentración de <i>L. acidophilus</i> realizado en Minitab 1.6..... | 47 |
| Figura 2. Test Kruskal-Wallis para concentraciones de <i>L. acidophilus</i> ATCC® 4356 frente a <i>P. acnes</i> ATCC®11827 | 48 |
| Figura 3. Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test de las concentraciones de <i>L. acidophilus</i> ATCC® 4356 frente a <i>P. acnes</i> ATCC®11827..... | 49 |
| Figura 4. Diagrama de caja del diámetro de halos de inhibición vs las lociones experimentales, realizado en Minitab 1.6 | 52 |
| Figura 5. Test Kruskal-Wallis para las cuatro lociones con <i>L. acidophilus</i> ATCC® 4356 frente a <i>P. acnes</i> ATCC®11827 | 53 |
| Figura 6. Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test las cuatro lociones con <i>L. acidophilus</i> ATCC® 4356 frente a <i>P. acnes</i> ATCC®11827 | 54 |
| Figura 7. Porcentaje de adolescentes con acné tipo I, II y III, en la muestra de estudio.. | 58 |
| Figura 8. Porcentaje de hombres y mujeres con presencia de acné en la en la muestra de estudio | 59 |
| Figura 9. Porcentaje de adolescentes con acné vs edad en la en la muestra de estudio... | 59 |
| Figura 10. Número de adolescentes vs porcentaje de disminución de porfirinas | 61 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Certificado de análisis de la bacteria <i>P. acnes</i> | 72 |
| Anexo 2. Certificado de análisis de la bacteria <i>L. acidophilus</i> | 74 |
| Anexo 3. Fotografías de la activación de las cepas bacterianas..... | 76 |
| Anexo 4. Fotografías de la prueba de antagonismo de <i>L. acidophilus</i> | 77 |
| Anexo 5. Fotografías de la adición de <i>L. acidophilus</i> en las lociones | 77 |
| Anexo 6. Prueba de antagonismo de las cuatro lociones | 78 |
| Anexo 7. Fotografías del test de irritabilidad..... | 79 |
| Anexo 8. Fotografías de la actividad cosmética <i>in vivo</i> | 80 |
| Anexo 9. Encuesta de selección de participantes para el test de irritabilidad..... | 81 |
| Anexo 10. Carta de consentimiento de los voluntarios para el test de irritabilidad..... | 83 |
| Anexo 11. Ficha de información básica de los voluntarios a participar en el test de irritabilidad..... | 87 |
| Anexo 12. Historia clínica de los voluntarios para el test de actividad cosmética | 88 |
| Anexo 13. Carta de consentimiento de los voluntarios para el test de actividad cosmética | 90 |
| Anexo 14. Certificado de evaluación dermatológica | 93 |

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto antagónico *in vivo* del *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) contra *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), bacteria causante del acné, mediante la formulación de una loción.

Para llevar a cabo la presente investigación, primero se realizó la evaluación del efecto antagónico *in vitro* del *L. acidophilus* y de cuatro diferentes lociones primarias adicionadas *L. acidophilus*, utilizando el método Anukool, con la medida de los halos de inhibición obtenidos y mediante el análisis de varianza no paramétrico de una vía de Kruskal-Wallis y el test *a posteriori* (All-Pairwise Comparisons Test), en el software Statistix 8.0., se obtuvieron resultados que permitieron determinar que 1×10^8 ufc/ml es la concentración en la cual *L. acidophilus* inhibe el crecimiento de *P. acnes*. El análisis también determinó que la loción A, fue la formulación que presentó mayor inhibición *in vitro* siendo la idónea para ser utilizada en el estudio *in vivo*, esta formulación fue sometida a una prueba de irritabilidad (Patch Test Simple único) dando como resultado un índice de irritación primaria cutánea de 0.19 que la califica como “bien tolerada”, lo que indica que no causa irritación en la piel y puede ser usada con seguridad en el estudio de actividad cosmética *in vivo*.

Para el estudio de actividad cosmética *in vivo* se utilizó el método de exploración no invasiva, empleando el instrumento de bioingeniería Visiopor PP 34N®, que cuantifica las porfirinas presentes en la piel. Mediante un análisis matemático se determinó que hubo disminución de porfirinas durante el tratamiento lo que indica que la loción tiene un efecto antagónico contra *P. acnes* y puede utilizarse de una manera confiable en el tratamiento de esta patología.

Palabras clave: *Lactobacillus acidophilus*, *Propionibacterium acnes*, efecto antagónico, loción, *in vitro*, *in vivo*

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the *in vivo* antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus* (*L.acidophilus*) against *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) the bacteria causing acne, by formulating a lotion.

To carry out this investigation, first evaluating the antagonistic effect *in vitro* of *L. acidophilus* and four lotion with *L.acidophilus* was performed using the Anukool method, by measuring the halos of inhibition obtained and by analyzing one-way nonparametric Kruskal-Wallis test and a posteriori (All-Pairwise Comparisons test) in the Statistix 8.0 software, variance results have revealed that 1×10^8 cfu/ml concentration is obtained in which *L. acidophilus* inhibits the growth of *P. acnes*. The analysis also found that the lotion A, was the formulation showed higher inhibition *in vitro* being suitable for use in the *in vivo* study, this formulation was subjected to a test of irritability (Patch Test only Simple) resulting in an index primary skin irritation 0.19 that qualifies as "well tolerated", indicating that does not cause skin irritation and can be safely used in the study of cosmetic activity *in vivo*.

To study cosmetic activity *in vivo* non-invasive method used exploration using bioengineering instrument Visiopor PP34N®, which quantifies the porphyrins in the skin. Through a mathematical analysis it was determined that there was a decrease of porphyrins during treatment indicating that the lotion has an antagonistic effect against *P. acnes* and can be used reliably in the treatment of this disease.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*, *Propionibacterium acnes*, antagonistic effect, lotion, *in vitro*, *in vivo*

INTRODUCCIÓN

Al ser considerado el acné, una de las patologías más importantes en el campo de la dermatología, que afecta tanto estéticamente como psicológicamente a las personas que lo padecen, la presente investigación sugiere la incorporación de nuevos tratamientos para controlar dicho padecimiento.

El tratamiento del acné debe ajustarse a las condiciones propias de cada individuo, dependiendo de la edad del individuo, del tipo y severidad de la patología.

Muchos tratamientos para el acné se basan en el uso de antibióticos, pero estos productos generalmente destruyen la flora normal de la piel, o generan una resistencia empeorando la afección.

Algunas bacterias lácticas probióticas pueden ser una alternativa para ayudar tanto a la restauración de la flora bacteriana normal de la piel como a la vez servir de antagonistas de bacterias patógenas. Existen estudios previos de la capacidad de bacterias lácticas para inhibir el acné producido por *P. acnes*, los mecanismos de inhibición son disminución del valor del pH, producción de ácidos, excreción de los antibióticos naturales, bloqueo de adherencia del patógeno y competencia por nutrientes.

El presente trabajo presenta un nuevo enfoque terapéutico para el acné, una propuesta de la utilización de *L. acidophilus* (bacteria láctica probiótica) como agente antagónico para inhibir el crecimiento de *P. acnes*. La investigación se realizará en dos fases, la primera *in vitro* mediante el método de difusión de agar modificado y la segunda *in vivo* utilizando un instrumento de bioingeniería, el equipo Visiopor PP 34N®.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Planteamiento del problema

La resistencia de *P.acnes* a los antibióticos se considera un problema de gran importancia al momento de combatir el acné. Esto se debe a terapias prolongadas con un mismo medicamento, dicho fenómeno se presenta entre las 12 y 24 semanas de tratamiento. El antibiótico que crea más resistencia tópica es la eritromicina, debido al uso continuado durante muchos años (Sociedad Argentina de Dermatología, 2005).

Los individuos que sufren de acné a menudo buscan tratamientos para combatirlo, y algunos de éstos pueden hacer que las condiciones empeoren. Productos de cuidado de la piel que se comercializan para las personas que padecen de acné suelen utilizar productos químicos irritantes como el peróxido de benzoilo, que destruyen el manto lipídico, sensibilizando la piel y condicionándola a un uso continuo (LeDuc, 2009).

Por otra parte, nuestra piel proporciona un hábitat a gran variedad de microorganismos, la mayoría de ellos inofensivos; que al estar en desequilibrio pueden acrecentar patologías como la del acné. Por lo que, el uso de cosméticos que contengan bacterias beneficiosas, que puedan devolver el equilibrio natural a la flora de la piel, sería una alternativa efectiva a los productos antibacterianos generalmente utilizados (que no equilibran, sino que eliminan todos los microorganismos).

“Diversos estudios muestran el éxito de las bacterias lácticas probióticas como nuevos principios activos para los cosméticos utilizados en el tratamiento y prevención del acné; pruebas *in vitro* revelan la efectividad de hasta 91% para inhibir a *P. acnes*” (Orellana, 2012).

Por esta razón, el presente trabajo tuvo como objetivo demostrar la capacidad antagónica del *Lactobacillus acidophilus*; incorporándolo en fórmula cosmética primaria que permitió realizar una prueba de actividad cosmética *in vivo*, y obtener resultados que nos permiten promoverla como una alternativa en el tratamiento del acné.

1.2 Justificación

Las bondades de los probióticos para la salud humana han sido ampliamente reconocidas y demostradas por Metchnikoff (1907) hasta la actualidad. Entre los principales beneficios que poseen podemos citar su contribución metabólica, la inhibición de patógenos (Salminen, Ouwehand, & Isolauri, 1998). El espectro de microorganismos utilizados como probióticos en humanos es muy amplio e incluye especies de muchos géneros diferentes como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y algunas levaduras del género *Saccharomyces* (Collins, Thornton, & Sullivan, 1998).

Partiendo de la noción de que los probióticos son capaces de inhibir ciertos patógenos, la idea de que estos son útiles para combatir el acné causado por la proliferación *P. acnes* y otras bacterias patógenas no es nueva. En 1992, se realizaron los primeros estudios de bacterioterapia tópica, mediante la aplicación local del *Lactobacillus bulgaricus*, demostrando que este puede ser útil en el tratamiento del acné y la seborrea (Peral, Martinez, & Valdez, 2009). Fue en 1999, que se llegó a demostrar que el ácido láctico del *Streptococcus thermophilus*, una bacteria encontrada en los yogures, presenta beneficios específicos en piel, ya que, puede aumentar la producción de ceramida cuando se aplica en la piel durante 7 días (Di Marzio, Cinque, De Simone, & Cifone, 2003).

Esta investigación, fue replicada por ser de gran interés para el tratamiento del acné, principalmente si se supone que algunos de los esfingolípidos de esta ceramida, en especial la fitosfingosina (PS), proporcionan actividad antimicrobiana frente a *P. acnes* (Pavicic, Wollenwebe, Farwick, & Korting, 2007).

En otras investigaciones realizadas se muestra que numerosas bacterias probióticas pueden proporcionar actividad antimicrobiana *in vitro* contra *P. acnes*, como es el caso del *Enterococcus faecalis* SL-5 que al ser aplicado tópicamente a través de una loción

durante 8 semanas reduce las lesiones inflamatorias causadas por el *P. acnes* en más del 50% frente a placebo (Kang, Seo, Lee, Kim, Kim, & Han, 2009).

No existe información detallada de la actividad antagónica de *L. acidophilus* frente a *P. acnes*, sin embargo, existe un estudio *in vitro* de la capacidad de las bacterias probióticas para inhibir el acné producido por *P. acnes*, como el realizado por Al-Ghazzewi y Tester (2010), donde se estudió cuatro cepas de lactobacilos (en su mayoría de origen humano), *Lactobacillus casei* ssp. *casei* NCFB161, *L. acidophilus* NCFB 7148, *Lactobacillus Plantarum* DSM 12028, *Lactobacillus gasseri* NCFB 2233 y una cepa de lactococos (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* NCIMB 6681) las cuáles presentaron una inhibición significativa en el crecimiento del *P. acnes* NCTC737, pero no se llegó a definir concentraciones de inhibición, ni llegó a ser probado *in vivo*.

En pocas palabras, la aplicación de bacterias probióticas en la piel puede proporcionar un escudo protector, similar a una barrera física (Brook, 1999).

Por lo antes mencionado, esta investigación se enfocó en el estudio de la capacidad antagónica del *L. acidophilus* bacteria láctica probiótica frente a la *P. acnes* patógeno causante del acné, con el objetivo de obtener una formulación cosmética primaria formulada con *L. acidophilus* que tenga efecto inhibitorio de *P. acnes*; formulación que será probada *in vivo* en una población de jóvenes de la Parroquia de Zámbara con acné tipo II, evaluados dermatológicamente.

1.3 Hipótesis

Hipótesis alternativa

El *Lactobacillus acidophilus* presenta actividad antagónica frente a *Propionibacterium acnes* en un estudio *in vivo* realizado sobre una población de jóvenes con acné tipo II.

Hipótesis nula

El *Lactobacillus acidophilus* no presenta actividad antagónica frente a *Propionibacterium acnes* en un estudio *in vivo* realizado sobre una población de jóvenes con acné tipo II.

1.4 Objetivos

Objetivo general

Evaluar *in vivo* la capacidad antagónica de *Lactobacillus acidophilus* frente a *Propionibacterium acnes* en jóvenes de la Parroquia de Zámbriza, Quito, con diagnóstico previo de acné tipo II.

Objetivos específicos

- Establecer *in vitro* la o las concentraciones en la cual *Lactobacillus acidophilus* ATCC[®] 4356 tiene efecto inhibitor de *Propionibacterium acnes* ATCC[®]11827.
- Evaluar *in vitro* el efecto antagónico de las lociones elaboradas a base de *Lactobacillus acidophilus* ATCC[®] 4356 sobre *Propionibacterium acnes* ATCC[®]11827.
- Determinar la formulación con mayor efecto inhibitor.
- Efectuar un test de irritabilidad para determinar la capacidad de irritación cutánea de la loción, mediante el método de patch test simple y único.
- Evaluar *in vivo*, la acción antagónica de la fórmula cosmética primaria en jóvenes de 14-19 años de edad en la Parroquia de Zámbriza con diagnóstico de acné tipo II, mediante el equipo de bioingeniería Visiopor[®] PP 34.

1.5 Variables

Variable dependiente

Cantidad de porfirinas presente en la piel, producidas por *Propionibacterium acnes*, durante el estudio *in vivo* con la loción.

Variable independiente

Concentración en ufc/ml de *Lactobacillus acidophilus* aplicadas a una formulación cosmética primaria.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 El acné

El acné es un padecimiento inflamatorio habitual que está asociado con la proliferación anormal de las bacterias que conforman la flora normal del folículo sebáceo, se identifica por la aparición de comedones, pápulas, pústulas y quistes purulentos superficiales o profundos y en unos casos por presentar descamación e hiperpigmentación. Las estadísticas indican que un 40% de las mujeres entre 14 y 17 y un 35% de los hombres entre 16 y 19 años son afectados por el acné (Gómez, 2003).

2.2 Fisiología del acné

Tres factores son preponderantes en el acné. Estos son:

La seborrea

La síntesis de sebo es influyente en el acné, por ayudar a la formación de comedones y al irrigarse por la piel, produce inflamación. Sin embargo no hay evidencia de que el sebo este aumentado antes de la aparición de acné (Sociedad Argentina de Dermatología, 2005).

La hiperqueratinización folicular

Se origina por un incremento anormal de la queratinización folicular, generalmente a nivel de la capa granulosa y de la capa córnea. Derivando en: compresión del sebo, dilatación del parte intradérmica del conducto folicular, hiperqueratosis; conduciendo así a la aparición del comedón (Claude, 2005, p. 49).

Flora bacteriana

La flora de los folículos sebáceos está constituida por *Propionibacterium acnes*, el *Staphylococcus epidermidis*, y *Pityrosporum ovale*.

El *P. acnes* es el microorganismo patógeno del acné, mientras que los dos últimos habitan simplemente en la parte superior del folículo y no ejercen un papel patogénico (Sociedad Argentina de Dermatología, 2005). De acuerdo con lo antes mencionado, en esta investigación la bacteria de interés será *P. acnes* por desempeñar un papel importante en la patología del acné.

2.2.1 *Propionibacterium acnes*

“Bacilo Gram positivo, inmóvil, casi siempre tienen forma de masa con un extremo afilado y el otro redondeado, catalasa positiva y aerotolerantes” (Pedrique & Gutiérrez, 2002).

Coloniza el ducto folicular, por ser rico en células foliculares y sebo, y puede proliferar en la piel. Esta bacteria favorece al desarrollo de la inflamación pues las lipasas que tiene la bacteria, descomponen los triglicéridos del sebo a ácidos grasos libres, que irritan la pared folicular; de tal modo que el epitelio folicular es invadido por linfocitos, provocando la ruptura del folículo; liberando el sebo, los microorganismos y la queratina dentro de la dermis; clínicamente si esta ruptura ocurrió superficialmente brotan pápulas y pústulas, mientras que si lo hace en la dermis profunda define el brote de nódulos y quistes (Ulate, 2005).

Clasificación Taxonómica

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *P. acnes*

| | |
|------------------|-----------------------------|
| Filo: | <i>Actinobacteria</i> |
| Orden: | <i>Actinomycetales</i> |
| Suborden: | <i>Propionibacterineae</i> |
| Familia: | <i>Propionibacteriaceae</i> |
| Género: | <i>Propionibacterium</i> |
| Especie: | <i>P. acnes</i> |

Nota: Se muestra la estructuración del *P. acnes* en taxones

Fuente: Orozco, 2013

2.3 Clasificación del acné

Tipo I: También llamado acné comedón. Presenta comedones, pápulas eritematosa (rojizas) y pústulas.

Tipo II: Acné pápula- pustuloso. Tiene presencia de comedones con preponderancia de pápulas eritematosas y de pústulas.

Tipo III: Presenta comedones, pápulas, pústulas y quistes. Al romper la pared folicular se forman los quistes.

Tipo IV: Acné conglobado más severo que el grado anterior. Al drenar los quistes se forman fístulas (De Bem, 2007).

2.4 Tratamientos para el acné

El acné es un padecimiento con impacto psicológico y social, que en algunas ocasiones puede desencadenar en trastornos de ansiedad, depresión o aislamiento social, por lo que se recomienda a empezar un tratamiento lo más rápido posible, para evitar cicatrices

tanto físicas como psicológicas (Gómez & Molina, 2012). Los tratamientos que se usan son tópicos y sistémicos dependiendo de la severidad del acné; sin embargo se presentara una alternativa que es la bacterioterapia.

2.4.1 Tópico

Tabla 2. Tratamientos tópicos utilizados en el acné

| | Mecanismo de acción | Empleados para el tratamiento | Fármacos usados |
|--------------------------------|--|--|--|
| Retinoides tópicos | Inhibir la formación de comedones, e intervenir en la reducción y expulsión de los mismos. | Acné inflamatorio leve a moderado y de acné comedón. | Tretinoína Adapaleno Tazaroteno |
| Antimicrobianos tópicos | Reducir la población de <i>P. acnes</i> en los folículos sebáceos. | Acné inflamatorio leve a moderado | Eritromicina Clindamicina Peróxido de benzoilo Ácido azelaico |

Nota: Se utiliza para los pacientes con acné leve y como complemento en el acné moderado.

Elaborado por: Victoria Pumisacho

2.4.2 Sistémico

Tabla 3. Tratamientos sistémicos utilizados en el acné

| | Mecanismo de acción | Empleados para el tratamiento | Fármacos |
|--------------------------|---|--|---|
| Antibióticos | Actúan contra <i>P. acnes</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i> dentro del folículo piloso. | Acné moderado y severo | Tetraciclinas Azitromicina Eritromicina |
| Retinoides orales | Disminuir el tamaño y secreción de glándulas sebáceas, prevenir el brote de nuevos comedones, normalizar la queratinización folicular e inhibir el crecimiento de <i>P. acnes</i> . | Acné moderado y severo | Isotretinoína |
| Terapia hormonal | Disminuir la producción de sebo debido a la acción de los andrógenos sobre el folículo sebáceo. | Usada en mujeres adultas con hiperandrogenismo el acné se presenta durante la menstruación y no responden a terapia tópica convencional. | Desogestrel Gestodeno Ciproterona Prosperinona |

Nota: Se usan principalmente antibióticos y retinoides.

Elaborado por: Victoria Pumisacho

2.4.3 Bacterioterapia

Es la inoculación de bacterias mediante la cual se puede tratar diversas patologías. La bacterioterapia tiene dos mecanismos de acción que son: formación de anticuerpos (método de Wright) aplicando un cultivo

desactivado del mismo patógeno causante de la enfermedad, y el otro es el empleo de un microorganismo con actividad antagónica del agente patógeno (García, 2011).

Al parecer, mediante la bacterioterapia no sólo trata afecciones internas (periodontales e intestinales), sino también afecciones de la piel, puesto que diversas investigaciones demuestran que los niños que ingieren suplementos bacterianos, son menos propensos a desarrollar eczema o dermatitis atópica. Pero no solo son de utilidad en el tratamiento de la dermatitis atópica, recientes experimentos ilustran que la inoculación de bacterias por vía tópica podría tener efectos favorables en la protección contra rayos UV, hidratación cutánea y tratamiento de acné (Losada, Vicario, Pujol, Sanz, & Nart, 2012).

Partiendo de la noción de la bacterioterapia tópica como una forma alternativa y prometedora para combatir el acné, se plantea estudio para conocer si la aplicación de *L. acidophilus* incorporado a una formulación cosmética primaria posee potencial antagónico frente a *P. acnes* patógeno causante del acné en una población de jóvenes con diagnóstico de acné tipo II.

2.5 Microorganismos antagónicos

Los mecanismos de acción por los que los microorganismos antagónicos afectan a las poblaciones de patógenos no son claros, pero casi siempre se le atribuyen cuatro efectos (Rodríguez, 2002):

1. Parasitismo directo y muerte del patógeno
2. Competencia con el patógeno por alimento
3. Efectos tóxicos directos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista.

4. Efectos tóxicos indirectos sobre el patógeno por sustancias volátiles, liberadas por las actividades metabólicas del organismo antagonico.

Algunos de los microorganismos antagonicos más estudiados son las bacterias lácticas probióticas por presentar un complejo sistema antagonista que no reside simplemente en la producción de ácido láctico sino en la de otros metabolitos inhibitorios que favorecen significativamente en dicho efecto (Álvarez, 2011).

2.6 Bacterias ácido lácticas (BAL)

2.6.1 Características generales

“Son un grupo de bacterias Gram-positiva, muy heterogéneo, que están representadas por varios géneros de importancia como son: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Bifidobacterium*” (Leveau & Carballo, 2000).

Estas bacterias no esporuladas, comúnmente no móviles producen ácido láctico como principal producto de su fermentación. Todas las BAL crecen de forma anaeróbica, sin embargo, la mayor parte de ellas no son sensibles a O₂ y pueden crecer en su presencia o ausencia, por lo que se les define como anaerobios aerotolerantes (Hernández, Pantoja, & Turriago, 2002).

El antagonismo de las BAL frente a un gran número de microorganismos patógenos, se debe a los productos finales de su fermentación, estos son: ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, y bacteriocinas (Shirai, Guerrero, & Lara, 1996).

Hoy en día, numerosos tipos de BAL son consideradas probióticas por provocar acción protectora contra la adherencia, colonización y reproducción de los patógenos, mediante distintos mecanismos que no han sido completamente establecidos. Las principales BAL

utilizadas como probióticos pertenecen a especies de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium* (Álvarez, 2011).

2.6.2 Importancia de las BAL

2.6.2.1 Efecto inhibidor

La producción de diversas sustancias de defensa le confieren un carácter antagónico frente a diversos patógenos. Estas sustancias son ácido láctico y ácido acético que mediante su acumulación reducen el pH del ambiente dando un efecto inhibitorio de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas; peróxido de hidrógeno el cual genera radicales hidroxilo que causan peroxidación a los lípidos de la membrana produciendo susceptibilidad de la célula microbiana de muchos microorganismos (Vázquez, Suarez, & Zapata, 2009); diacetilo que muestra actividad antimicrobiana a niveles de 200 ug/ml para levaduras y bacterias Gram-negativas y a 300 ug/ml para bacterias Gram-positivas no lácticas (Axelsson, 1998); y las bacteriocinas que son proteínas biológicamente activas, que presentan acción bactericida sobre receptores específicos de las células; al mismo tiempo, la composición química de estas sustancias es muy variada y su modo de acción específico.

Las bacteriocinas que producen las BAL han sido intensamente estudiadas por su actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella* entre otros (Vázquez, Suarez, & Zapata, 2009).

2.6.2.2 Potencial probiótico

Los probióticos son bacterias vivas que contribuyen a mantener el equilibrio microbiano (Fuller, 1989). Recientemente Schrezenmeier y De Vrese (2001) han redefinido el concepto, puntualizando que un probiótico es “un preparado o producto que contiene microorganismos definidos, viables y en número suficiente para modificar la microbiota de un ecosistema del hospedador ejerciendo como consecuencia efectos beneficiosos

sobre la salud” (Salminen et al., 1998). Los probióticos influyen de manera directa e indirecta en el estado de salud de producción de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta, degradación de sustancias alimenticias no digeridas, estimulación de la respuesta inmune y protección frente a microorganismos patógenos al incrementar la resistencia mediante la colonización competitiva y la producción de ácidos orgánicos (Salminen et al., 1998).

Para que un microorganismo pueda ser calificado como probiótico tiene que tener las siguientes características: no ser patógeno, ni tóxico, mostrar potencial de colonización, y producir sustancias antimicrobianas (Mendoza, 2009).

2.6.3 Características del género *Lactobacillus*

Los lactobacilos son bacterias Gram-positivas que tienen forma bacilar, no esporulados, aerotolerantes o anaeróbicos, el crecimiento óptimo se da a temperatura de 30-40 °C a pH de 5.5-5.8 (resisten condiciones de acidez). El medio de cultivo más utilizado para su crecimiento es el medio M.R.S desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe en 1960, que es el M.R.S en honor a sus autores, este medio facilita el crecimiento de los bacilos lácticos, inclusive de las especies más exigentes (Rodríguez, 2009).

El género *Lactobacillus* es el más grande, intuyendo alrededor de 80 especies conocidas y distribuidas en tres grupos, basándose en las características fermentativas que poseen y son: homofermentativas estrictas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas estrictas. Las especies de *Lactobacillus* más usadas más como probióticos son *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, y *L. casei* (Axelsson, 1998).

Al ser el *L. acidophilus* uno de los probióticos más utilizados y en base al estudio de Al-Ghazzewi & Tester, 2010 que muestran acción antagónica frente a *P. acnes* ha sido seleccionada como bacteria de interés en esta investigación.

2.6.3.1 *Lactobacillus acidophilus*

Es una bacteria Gram-positiva presenta células en forma de bacilos medianos aislados o en cadenas cortas, miden unas 2-6 um de largo, son convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos; crece en condiciones óptimas de pH 4.5 y temperatura de 37°C (Samaniego & Sosa, 2002).

El *L. acidophilus* ha sido reconocido como un microorganismo probiótico al jugar un papel importante al inhibir la proliferación de microorganismos, como *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Shigella*, *S. entérica*, y *C. albicans* (Zambrano, 2010); hay estudios *in vitro* recientes que muestran una inhibición significativa en el crecimiento del *P. acnes*, los cuales dejan una puerta abierta para continuar la investigación ya que no presenta concentraciones de inhibición y tampoco ensayos *in vivo* (Al-Ghazzewi & Tester, 2010).

Clasificación taxonómica

Tabla 4. Clasificación taxonómica de *L. acidophilus*

| | |
|------------------|-------------------------|
| Reino: | <i>Bacteria</i> |
| División: | <i>Firmicutes</i> |
| Clase: | <i>Bacilli</i> |
| Orden: | <i>Lactobacillales</i> |
| Familia: | <i>Lactobacillaceae</i> |
| Género: | <i>Lactobacillus</i> |
| Especie: | <i>L. acidophilus</i> |

Nota: Se muestra la estructuración de *L. acidophilus* en taxones

Fuente: European Bioinformatics Institute, 2002

2.7 Pruebas de actividad antagónica *in vitro*

El antagonismo es un mecanismo basado en la actividad inhibitoria directa entre dos microorganismos, ya sea por competición por nutrientes, producción de enzimas líticas, inhibición de compuestos difusibles o combinación de varios de estos modos de acción. Estos ensayos buscan evaluar la capacidad de las BAL para inhibir bacterias patógenas de los humanos. Estas pruebas se realizan mediante dos métodos directo e indirecto (Getha & Vikineswary, 2002).

2.7.1 Método directo

En este método los microorganismos antagónicos y el patógeno se desarrollan simultáneamente en un mismo medio y a las mismas condiciones. Estas pruebas se determinan positivas cuando presentan halos de inhibición. Son métodos cuantitativos ya que pueden tomar medidas de los halos de inhibición generados. Un método directo es el método Anukool (Rodríguez, 2002).

2.7.2 Método indirecto

Consiste en el desarrollo del microorganismo patógeno en un medio previamente tratado y seguidamente la adición de alícuotas del antagonista respectivo. Un método indirecto es la técnica de excavación en placa (Rodríguez, 2002).

2.8 Lociones

Son emulsiones con una viscosidad lo suficientemente baja para fluir fácilmente bajo la influencia de la gravedad. Las lociones permiten su aplicación en áreas extensas de la piel dejando una película fina de principios activos y excipientes. (Rodríguez J. , 2004)

Como vehículo para la preparación de lociones se encuentra en primer lugar el agua purificada a la cual se puede adicionar alcohol en pequeña cantidad, glicerina, polietilenglicol (PEG), sorbitol o propilenglicol, sustancias que permitan una adhesión

más fácil de la loción a la piel y puedan mejorar la plasticidad de la película que se forma (Sharapin, 2000).

2.8.1 Control de calidad

De acuerdo con la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil (2005) los parámetros a ser evaluados deben ser definidos por el formulador y dependen de los componentes utilizados y del tipo de formulación en estudio. Se sugiere realizar:

Evaluación organoléptica:

Las características organolépticas determinan los criterios de aceptación del producto por el consumidor. De modo general se evalúa: aspecto, color, olor, sabor y sensación al tacto.

Evaluación físico-química:

Este tipo de análisis puede mostrar problemas de estabilidad entre ingredientes. Los análisis físico-químicos sugeridos son: valor de pH, viscosidad, densidad, viscosidad y conductividad eléctrica, tamaño de partícula, contenido de agua, humedad entre otros.

Para este estudio se precisa evaluar características organolépticas como color, olor y textura y el valor de pH como única característica físico-química, por ser de gran importancia, ya que de este valor depende si las bacterias pueden sobrevivir dentro de la loción y también podemos conocer si este va acorde con el rango de pH normal de la piel que va desde 5.5 a 6.5 y así no causar algún tipo de irritación cutánea en los pacientes (Vásquez, 2008).

2.9 Seguridad cosmética

Existen pruebas que un producto cosmético debe superar, antes de ser comercializado, y estos son:

- Elaboración del dossier toxicológico: es preciso que todos los productos cosméticos de una empresa sean sometidos a una evaluación toxicológica de todos los ingredientes que están presentes en la fórmula del cosmético (López, Louzán, & Gonzales, 2013).
- Métodos de evaluación toxicológica: utilizados con el fin de evaluar la toxicidad de productos cosméticos y confirmar que no se produce ningún tipo de irritación o sensibilización, tanto en condiciones extremas o en condiciones normales, así como para valorar otros aspectos como la comedogenia, fotosensibilización, fotoirritación (López, Louzán, & Gonzales, 2013).
- Evaluación sensorial: la evaluación sensorial de un (o varios) producto(s) cosmético(s) con la ayuda de un panel sensorial entrenado, permite un perfil de un producto elaborado con criterios predefinidos o por la comparación con productos existentes (Del Cañizo, 2005).

2.9.1 Test de irritabilidad único

Las pruebas epicutáneas o "Patch test simple y único" constituyen un método sencillo y accesible para averiguar o confirmar la inocuidad de un producto en la piel (Salazar, 2006).

El cual consiste en la aplicación oclusiva de un producto sobre una zona de la piel, en el presente trabajo será el brazo, durante 48 horas, permite verificar, en 10 a 20 sujetos, la buena compatibilidad cutánea después de una sola aplicación, seguida de un examen macroscópico realizado según una escala numérica establecida (Instituto Español de Experimentación Clínica, 2007).

2.10 Actividad cosmética *in vivo*

Tras la valoración de la seguridad del producto cosmético, se puede proceder a la evaluación de sus propiedades cosméticas mediante estudios de su eficacia con ensayos en voluntarios humanos seleccionados según determinados criterios de inclusión. Se pueden diseñar protocolos experimentales específicos según la tipología de producto, sus propiedades y claims (claim se define como la información pública de la naturaleza, las propiedades y estudios de eficacia de un producto) (CDC de Bio Basic Europe S.r.l., 2002).

La eficacia se apoya en tres enfoques: sensorial, clínico e instrumental. La presente investigación será de tipo instrumental, ya que, utiliza métodos no invasivos, que están destinados a la exploración de las propiedades de la piel y a medir de manera objetiva el efecto de un producto cosmético (Del Cañizo, 2005). Para esta evaluación se utilizó la cámara analógica con luz ultravioleta Visiopor PP34N®, equipo que permite visualizar la fluorescencia propia de las porfirinas producidas por *P. acnes* bacteria causante del acné (Microcaya, 2012).

2.10.1 Métodos de exploración no invasivos

Los métodos de exploración no invasivos (MENI), no afectan a la integridad de la piel y son reproducibles y fiables, se emplean para explorar las propiedades de la piel mediante la medición de características como: pérdida de agua, secreción de sebo, flujo sanguíneo, entre otras características que permiten evaluar de manera objetiva el efecto de un cosmético (Del Cañizo, 2005).

Entre los numerosos MENI descritos para estudiar las diversas condiciones de la piel, se conocen los siguientes: visión directa o con lupa, epiluminiscencia directa o con lupa, réplicas, fotografías, digitalización de imagen, pHmetro, colorimetría, termografía, sonometría con ultrasonidos, resonancia magnética de imagen, flujometría, corneometría, sebometría, evaporimetría y elastometría (Olmos, 2005).

2.10.2 Visiopor® PP 34 N

El Visiopor® PP 34 es una cámara análoga no invasiva que debe estar conectada a un ordenador con un hardware específico, para poder visualizar las lesiones del acné al ser expuestas a luz ultravioleta, que se evidencian por la presencia de porfirinas (fluorescencia de naranja a rojo en las aberturas de los folículos). Es importante conocer que la intensidad de la fluorescencia folicular y la medida de la participación son proporcionales a la densidad de población de *P. acnes* y el contenido de porfirinas en la superficie de la piel (CK electronic, 2012).

Por lo antes mencionado, se escogió al Visiopor® PP 34 como herramienta principal para este estudio de actividad cosmética *in vivo*, ya que, puede revelar de modo prematuro lesiones invisibles, visualizar pequeñas lesiones, demostrar la eficacia de productos antibacterianos y fármacos contra *P. acnes* y determinar la actividad comedogénica y comedolítica de productos de aplicación tópica (Microcaya, 2012).

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Lugar de investigación

La presente investigación se desarrolló en varias etapas, la parte *in vitro* que se desarrolló en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Quito, Campus Girón. La parte *in vivo*, el test de irritabilidad se realizó en la carrera de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana y el estudio de eficacia cosmética del gel fue ejecutado en la Unidad Educativa Pedro Luis Calero y en el Colegio Fernando Ortiz Crespo de la Parroquia de Zámiza, Distrito Metropolitano de Quito.

3.2 Determinación *in vitro* la concentración en la cual *L. acidophilus* ATCC® 4356 es antagonista de *P. acnes* ATCC®11827

El ensayo busca determinar en qué concentración el *L. acidophilus* tiene la capacidad de inhibir a *P. acnes* bacteria patógena del acné. Estas pruebas se realizarán mediante el método de Anukool que evaluó la actividad antagonista.

3.2.1 Disposiciones generales de análisis

A. Material Biológico

Las cepas bacterianas utilizadas fueron cepas control del American Type Culture Collection (ATCC), marca Microbiologics – Kwik Stick Duo, el procedimiento de activación está basado en la metodología de Microbiologics (2011). El material biológico utilizado fue:

- *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356, cuyas características macroscópicas y microscópicas están definidas en el Anexo 2, y se la activo mediante el método 11 (Microbiologics, 2011).

- *Propionibacterium acnes* ATCC®11827 cuyas características macroscópicas y microscópicas están definidas en el Anexo 1, y se la activo mediante el método 4 (Microbiologics, 2011).

B. Reactivos

- Agar M.R.S (Man, Rogosa, Sharpe)

El Agar M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas. La peptona, el extracto de carne, el extracto de levadura y la glucosa constituyen la fuente nutritiva ya que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales. El monoleato de sorbitán, las sales de sodio, magnesio y manganeso proveen cofactores para el crecimiento bacteriano y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas (Thermo Scientific, 2001).

Tabla 5. Composición de agar MRS

| Fórmula | g/litro |
|---|----------------|
| Peptona | 10 |
| Extracto de carne | 8 |
| Extracto de levadura | 4 |
| Glucosa | 20 |
| Monoleato de sorbitán | 1 ml |
| Fosfato de hidrógeno dipotásico | 2 |
| Acetato de sodio 3H₂O | 5 |
| Citrato de triamonio | 2 |
| Sulfato de magnesio 7H₂O | 0.2 |
| Sulfato de manganeso 4H₂O | 0.05 |
| Agar | 10 |
| pH 6.2 ± 0.2 | |

Nota: El medio fue preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Fuente: Thermo Scientific, 2001

- Caldo M.R.S (De Man, Rogosa, Sharpe)

El Caldo M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y de otras bacterias ácido lácticas.

El Caldo MRS también se utiliza para realizar pruebas de identificación de lactobacilos, presentes en muestras clínicas y alimentos, especialmente lácteos (Thermo Scientific, 2001).

Tabla 6. Composición del caldo MRS

| Fórmula | g/litro |
|---|----------------|
| Peptona | 10 |
| Extracto de carne | 8 |
| Extracto de levadura | 4 |
| Glucosa | 20 |
| Monoleato de sorbitán | 1 ml |
| Fosfato de hidrógeno dipotásico | 2 |
| Acetato de sodio 3H₂O | 5 |
| Citrato de triamonio | 2 |
| Sulfato de magnesio 7H₂O | 0.2 |
| Sulfato de manganeso 4H₂O | 0.05 |
| pH 6.2 ± 0.2 | |

Nota: El medio fue preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Fuente: Thermo Scientific, 2001

- Agar Tripticasa de soya (TSA)

El TSA Agar es un medio de uso general que permite el crecimiento tanto de microorganismos exigentes como no exigentes, que incluyen bacterias aerobias y anaerobias. Tiene por base una fuente proteica (digeridos trípticos, digeridos proteicos de soja) con una pequeña cantidad de hidratos de carbono naturales, cloruro sódico y 5% de sangre.

Es un medio recomendado para la detección y recuento de una amplia gama de microorganismos. La aportación de caseína y peptonas de soya al Agar de Tripticasa-soya hace el medio muy nutritivo por el suministro de nitrógeno orgánico, particularmente aminoácidos y péptidos de cadena más larga. La presencia de estas peptonas en el medio permite el cultivo de una gran variedad de gérmenes aerobios y anaerobios que crecen rápidamente (BVA scientific, 2011).

Tabla 7. Composición del TSA

| Fórmula | g/litro |
|---------------------------|----------------|
| Peptona de Soya | 5 |
| Peptona de Caseína | 15 |
| Cloruro de Sodio | 5 |
| Agar | 15 |
| pH 7.3 ± 0.2 | |

Nota: El medio fue preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Fuente: BVA scientific, 2011

- Caldo Trypticasa de soya (TSB)

Caldo de enriquecimiento libre de sustancias inhibitorias y de indicadores, ampliamente utilizado en procedimientos de diagnóstico e investigación. Por su abundante base nutritiva, este medio es adecuado para el crecimiento de bacterias y levaduras exigentes. El medio fue preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

La peptona de caseína y la peptona de soya proporcionan al medio las fuentes de nitrógeno, carbono y aminoácidos necesarias para el desarrollo de los microorganismos, la dextrosa proporciona la fuente de energía, el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico y el fosfato ayuda a mantener el pH. El empleo de este medio de cultivo va a depender según los fines requeridos (BVA scientific, 2011).

Tabla 8. Composición del TSB

| Fórmula | g/litro |
|---------------------------|----------------|
| Cloruro de sodio | 5 |
| Dextrosa | 1 |
| Fosfato dipotásico | 5 |
| Peptona de Caseína | 0.5 |
| Peptona de soya | 0.7 |
| pH 7.3 ± 0.2 | |

Nota: El medio fue preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Fuente: BVA scientific, 2011

C. Lectura

La lectura de los resultados se realizó a las 72 horas tomando en cuenta las siguientes indicaciones:

Leer las placas por el reverso, contra un fondo negro iluminado con luz reflejada.

Los bordes de los halos (zonas de inhibición) deben leerse en el punto de completa inhibición según se aprecie a simple vista.

Los diámetros de la zona de inhibición se miden con una regla de pie de rey o con un lector automático.

En el caso en que haya colonias individuales dentro de los halos, éstas deberán subcultivarse, confirmar su pureza y repetir la prueba de sensibilidad si fuera necesario. (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2010)

3.2.2 Equipos

Tabla 9. Equipos utilizados

| Equipo | Marca | Modelo |
|-------------------------------------|------------------|---------------|
| Balanza analítica | METTLER TOLEDO | ML204/01 |
| Autoclave | TUTTNAVER | 3870 M |
| Vortex | MIXER | VM – 300 |
| Centrifugadora | SELECTA | 540 |
| Espectrofotómetro | SHIMADZU | uvmini – 1240 |
| Refrigeradora | INDURAMA | No frozen |
| Cámara de flujo laminar | FORMA SCIENTIFIC | 1845 |
| Plancha de calentamiento | VELP SCIENTIFICA | F20510100 |
| Incubadora de CO₂ | BINDER | CB 53-UL |

Nota: Descripción de los equipos utilizados en el laboratorio de la Universidad Salesiana

Elaborado por: Victoria Pumisacho

3.2.3 Procedimiento

A. Activación de las cepas bacterianas

- *L. acidophilus* ATCC® 4356

Primero se rompió la envoltura y se retiró el Kwik- Stick, se removió el sello de seguridad y se extrajo el hisopo, que se hallaba sumergido en un fluido hidratante, después se inoculó en dos cajas petri y en un tubo pico de flauta que contenían agar estéril MRS marca Oxoid, a continuación este hisopo fue introducido en un tubo de ensayo con 5ml de caldo estéril MRS marca Oxoid. Para el crecimiento de la bacteria los tubos y las cajas petri fueron incubados a 35⁰ C en 5 a 7% de CO₂ durante 48 horas.

- *P. acnes* ATCC®11827

Como primer paso se abrió la envoltura y se retiró el Kwik- Stick, se removió el sello de seguridad y se extrajo el hisopo, que se hallaba sumergido en un fluido hidratante, después se inoculó en dos cajas petri y en un tubo pico de flauta que contenían agar estéril TSA marca Difco, a continuación este hisopo fue introducido en un tubo de ensayo con 5ml de caldo estéril TSB marca Difco. Para el crecimiento de la bacteria los tubos y las cajas petri fueron colocados en una incubadora de anaerobiosis, a 37°C durante 72 horas. Algunas veces se puede demorar de 5 a 7 días para mostrar crecimiento suficiente.

B. Preparación de los inóculos

- *L. acidophilus* ATCC® 4356

De una caja petri, se tomó una fracción de colonias para inocularlas en un tubo de ensayo con 5 ml de caldo MRS estéril, que fue incubado por aproximadamente 20 a 24 horas a 37 °C. Al día siguiente se centrifugó 20 minutos a 4000 RPM, se eliminó el

sobrenadante y quedo sólo el pellet de biomasa, al que se añadió 4 ml de solución fisiológica al 0,9% y se agitó con ayuda de un Vortex de 1 a 3 minutos, hasta que las cepas se suspendieron en el suero fisiológico. Este inóculo fue diluido hasta alcanzar una absorbancia de 0,11 a una longitud de onda de 625 nm, para de esta manera obtener un inóculo bacteriano con una concentración equivalente a 1×10^8 ufc (unidades formadoras de colonias), partiendo de esta concentración se realizó diluciones seriadas en solución fisiológica obteniendo inóculos bacterianos con concentraciones equivalentes a 1×10^7 ufc y 1×10^6 ufc.

- *P. acnes* ATCC®11827

De una caja petri, se tomó una porción de colonias para inocularlas en un tubo de ensayo con 5 ml de caldo TSB estéril. El tubo de ensayo con el inóculo bacteriano fue llevado a la incubadora de CO₂ marca Binder por aproximadamente 18 a 20 horas a 37 °C. Al día siguiente se centrifugó 20 minutos a 3500 RPM, se eliminó el sobrenadante y quedo solo el pellet de biomasa, al que se añadió 4 ml de solución fisiológica al 0,9% y se mezcló con ayuda de un Vortex de 1 a 3 minutos, hasta que las cepas se suspendieron en el suero fisiológico. Este inóculo fue diluido hasta alcanzar una absorbancia de 0,11 a una longitud de onda de 625 nm, para de esta manera obtener un inóculo bacteriano con una concentración equivalente a 1×10^8 ufc (unidades formadoras de colonias).

C. Pruebas de antagonismo método Anukool

Este procedimiento está basado en el método propuesto por Anukool (2004).

Luego de haber ajustado la turbidez del inóculo, se tomó con una micropipeta 100 µl de inóculo de la bacteria patógena (*P. acnes* ATCC®11827) y se procedió a sembrar en 12 placas que contenían agar MRS estéril, este inóculo se dispersó por toda la superficie del agar con la ayuda de un hisopo estéril, se secó por aproximadamente 5 minutos y se colocaron discos de antibiograma tipo Whatmann de 6 mm de diámetro en cada caja petri. Una vez colocados los discos con una micropipeta graduada se dispensó 10 µL de las tres diferentes concentraciones de *L. acidophilus* ATCC® 4356 en cada disco, y como control negativo se colocó un disco impregnado de agua estéril. Las cajas fueron

colocadas en posición invertida dentro la incubadora de anaerobiosis, a 37°C en 5% de CO₂ por 72 horas. Finalmente esta prueba se determinó como positiva cuando se presentó una zona libre de crecimiento alrededor del disco de antibiograma. Esta prueba se realizó por cuadruplicado para garantizar un error inferior al 10% (CYTED, 1995).

3.2.4 Análisis estadístico

Se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis que determina si tres o más grupos de datos poseen medianas similares o no (entre bloques), en el programa Statistix 8.0

A continuación, se determinó la semejanza entre grupos, mediante una prueba a posteriori, en la que se seleccionaron los mejores resultados de los halos de inhibición para poder realizar la formulación de las lociones experimentales.

Para el test Kruskal-Wallis se plantearon las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula: las concentraciones utilizadas en el estudio de antagonismo tienen medianas del diámetro de los halos de inhibición estadísticamente similares.

Hipótesis alternativa: el valor de la mediana del diámetro del halo de inhibición generado por al menos una de las concentraciones es diferente.

Nivel de significancia (alfa): 0.05

Estadístico de la prueba: H

Decisión: se acepta la hipótesis alternativa si el valor de H calculado tiene una probabilidad asociada menor al alfa escogido ($p < 0.05$).

3.3 Loción con *L. acidophilus* ATCC®4356

Las lociones se elaboraron por el método tradicional a pequeña escala en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana sede Quito, siguiendo la metodología descrita por Acofarma para elaboración de lociones.

Las lociones fueron elaborada el mismo día de su uso para asegurar que la concentración de *L. acidophilus* ATCC ® 4356 sea la idónea.

3.3.1 Disposiciones generales de análisis

A. Material Biológico

- *L. acidophilus* ATCC® 4356 (bacteria láctica probiótica)

B. Reactivos

- Glicerina

Tabla 10. Información técnica de glicerina

| | |
|---|--|
| Sinónimos | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Glicerol. ➤ Alcohol glicérico. ➤ Propano-1,2,3-triol. |
| Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos (INCI) | Glycerin |
| Formula Molecular | C3H8O3 |

Nota: Debe conservarse en envases bien cerrados y proteger de la luz

Elaborado por: Victoria Pumisacho

Propiedades y usos:

La glicerina es un agente deshidratante osmótico con propiedades higroscópicas y lubricantes. Es emoliente, protegiendo y ablandando la piel.

Dosificación:

Como emoliente y humectante: 10- 30 % (Royal Society of chemistry, 2010).

- Carboximetilcelulosa sódica (CMCS)

Tabla 11. Información técnica de CMCS

| | |
|---|---|
| Sinónimos | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Carmelosa sódica ➤ Carboximetil éter de celulosa sal sódica. ➤ Glicolato de celulosa sódica ➤ NaCMC ➤ CMCS ➤ E466. |
| Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos (INCI) | Cellulose gum |

Nota: Debe conservarse en envases bien cerrados, proteger de la luz y de la humedad

Elaborado por: Victoria Pumisacho

Propiedades y usos:

Es ampliamente utilizada como emulsificante, como agente suspensor (de pólvoras insolubles en agua), dispersante (cuando aparecen precipitados), así como disgregante en comprimidos.

Dosificación:

Como emulgente: 0, 25 – 1 % (Royal Society of chemistry, 2010).

3.3.2 Equipos

Tabla 12. Equipos utilizados

| Equipo | Marca | Modelo |
|--------------------------------|------------------|---------------|
| Balanza analítica | METTLER TOLEDO | ML204/01 |
| Autoclave | TUTTNAVER | 3870 M |
| Vortex | MIXER | VM – 300 |
| Centrifugadora | SELECTA | 540 |
| Espectrofotómetro | SHIMADZU | uvmini – 1240 |
| Refrigeradora | INDURAMA | No frozen |
| Cámara de flujo laminar | FORMA SCIENTIFIC | 1845 |

Nota: Descripción de los equipos utilizados en el laboratorio de la Universidad Salesiana

Elaborado por: Victoria Pumisacho

3.3.3 Procedimiento

A. Formulación de la loción

Para la formulación de las lociones se utiliza un diseño experimental que permite combinar las siguientes variables críticas: glicerina y carboximetilcelulosa sódica, dando como resultado un diseño experimental factorial 2x2 siendo el más adecuado, ya que, las variables críticas son dos y pueden ser controladas en dos niveles que son el límite superior e inferior de dosificación especificados en la fichas técnicas de cada una; definiendo así cuatro posibles formulaciones.

Diseño experimental factorial 2x2

Se definen los factores:

Variable 1: cantidad de glicerina como agente humectante

1.- 10%

2.- 30%

Variable 2: cantidad de carboximetilcelulosa sódica como agente emulgente

1.- 0,25%

2.- 1%

Constante: cantidad de agua purificada c.s.p.

Tabla 13. Diseño experimental factorial 2 x 2

| Lociones posibles | Variable 1 | Variable 2 |
|--------------------------|-------------------|-------------------|
| A | 1 | 1 |
| B | 1 | 2 |
| C | 2 | 1 |
| D | 2 | 2 |

Nota: El diseño experimental da como resultado cuatro posibles lociones

Elaborado por: Victoria Pumisacho

Luego de definir las cuatro posibles formulaciones se procede a realizar la fórmula unitaria de cada una:

Tabla 14. Fórmula unitaria de la loción experimental A

| <i>Componentes</i> | <i>Porcentaje</i> | <i>Cantidad</i> |
|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| Glycerin | 10% | 2.5ml |
| Cellulose gum | 0.25% | 0.06 g |
| Agua destilada | c.s.p | 25ml |

Nota: Los componentes se encuentran en nomenclatura INCI

Elaborado por: Victoria Pumisacho

Tabla 15. Fórmula unitaria de la loción experimental B

| <i>Componentes</i> | <i>Porcentaje</i> | <i>Cantidad</i> |
|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| Glycerin | 10% | 2.5ml |
| Cellulose gum | 1% | 0.25g |
| Agua destilada | c.s.p | 25ml |

Nota: Los componentes se encuentran en nomenclatura INCI

Elaborado por: Victoria Pumisacho

Tabla 16. Fórmula unitaria de la loción experimental C

| Componentes | Porcentaje | Cantidad |
|-----------------------|-------------------|-----------------|
| Glycerin | 30% | 7.5ml |
| Cellulose gum | 0.25% | 0.06g |
| Agua destilada | c.s.p | 25ml |

Nota: Los componentes se encuentran en nomenclatura INCI

Elaborado por: Victoria Pumisacho

Tabla 17. Fórmula unitaria de la loción experimental D

| Componentes | Porcentaje | Cantidad |
|-----------------------|-------------------|-----------------|
| Glycerin | 30% | 7.5ml |
| Cellulose gum | 1% | 0.25g |
| Agua destilada | c.s.p | 25ml |

Nota: Los componentes se encuentran en nomenclatura INCI

Elaborado por: Victoria Pumisacho

B. Procedimiento de manufactura

Para la elaboración de las lociones se siguió la metodología ya antes mencionada.

Se colocó el glycerin junto con la cellulose gum, se mezcló hasta lograr una pasta homogénea, luego se añadió agua estéril hasta completar los 25ml sin dejar de agitar durante 5 minutos y se envaso en tubos de ensayo. Se siguió el mismo procedimiento en la elaboración de las cuatro lociones.

Para la adición del *L. acidophilus* ATCC®4356 a las lociones, se procedió a realizar un *over night* de la bacteria, al que se lo centrifugó 20 minutos a 4000 RPM, se eliminó el sobrenadante y quedó el pellet de biomasa. A este pellet de *L. acidophilus* ATCC®4356 se adicionó 4 ml de loción se agitó con ayuda de un Vortex de 1 a 3 minutos, hasta que las cepas se suspendieron en la loción; está fue diluída hasta alcanzar una absorbancia de 0,11 a una longitud de onda de 625 nm, para de esta manera obtener una loción con una concentración equivalente a 1×10^8 ufc/ml de *L. acidophilus*. Este procedimiento se lleva a cabo con las cuatro lociones.

C. Control de calidad

Según lo puntualizado en el apartado 2.8.1, los parámetros a tomar en cuenta son los siguientes:

- Análisis organoléptico: se determinó de manera sensorial, características como: color, olor y textura.
- Análisis físico – químico: se determinó el valor de pH mediante tiras indicadoras de pH.

Las tiras funcionan de la siguiente manera: La tira de papel indicadora se sumerge en la loción se espera de 10 a 15 segundos y se procede a comparar el color que obtuvo con la de la escala de colores que mide el pH.

3.4 Evaluación *in vitro* el efecto antagónico de las lociones elaboradas a base de *L. acidophilus* ATCC® 4356 frente a *P. acnes* ATCC®11827

Para realizar el estudio de la actividad antagónica de la loción con *L. acidophilus* ATCC® 4356, se llevó a cabo la misma metodología que se describió en el apartado 3.2.3 (literal C); aunque en este caso, en lugar de colocar concentraciones puras de *L. acidophilus* ATCC® 4356, se utilizaron las cuatro lociones experimentales directamente sobre los discos de antibiograma y como control negativo las lociones sin *L. acidophilus*.

Se realizaron las mismas pruebas estadísticas para poder contrastar los resultados de las cuatro lociones elaboradas, con lo que se definirá la loción con mayor potencial antagónico y con la cual se trabajara *in vivo*.

3.5 Evaluación de la inocuidad dérmica de la loción (test de irritabilidad)

A la fórmula con mayor actividad *in vitro* se la sometió a una prueba de irritabilidad con el fin de demostrar su inocuidad dérmica y poder ser aplicada *in vivo*. Para comparar la capacidad irritante de esta loción se utilizó la técnica del Patch Test simple único. El

número mínimo de personas para este tipo de estudios es de 20, los cuales deben cumplir criterios de inclusión y exclusión señalados en el apartado 3.5.1 (literales B y C).

Para iniciar con el estudio, se realizó una encuesta (Anexo 9) a 100 estudiantes de la Universidad Politécnica Salesiana para identificar si cumplen con los criterios de inclusión y exclusión; después de evaluar las encuestas se escogió a 40 voluntarios aptos, lo cuales firmaron una carta de consentimiento (Anexo 10) y llenaron una ficha de datos (Anexo 11) para participar voluntariamente en la prueba.

3.5.1 Disposiciones generales de análisis

A. Reactivos

Loción experimental

B. Criterios de inclusión

- Hombres y mujeres de 19 a 25 años de edad.
- Fototipos de la piel de I a IV.
- Ausencia de cualquier enfermedad visible en la piel que pueda ser confundida con una reacción cutánea causada por el producto estudiado.
- Firma y entendimiento de la aceptación de la Carta de Consentimiento.
- Capacidad y confiabilidad para seguir las instrucciones impartidas. (Bravo & Luque, 2010)

C. Criterio de exclusión

- Cualquier marca en la piel en el sitio de prueba que pueda interferir con la evaluación de posibles reacciones cutáneas (desórdenes de pigmentación, malformaciones vasculares, escaras, pilosidad aumentada, quemaduras solares).

- Dermatitis activa (local o diseminada) que pueda interferir con los resultados del estudio.
- Sujetos con trasplante de riñón, corazón o hígado.
- Embarazadas y madres lactantes.
- Panelistas con auto-reconocimiento de piel sensible.
- Personas que hayan usado esteroides tópicos o sistémicos y/o antihistamínicos por al menos 7 días antes del inicio del estudio o si se está aplicando cualquier medicamento en el sitio de aplicación del parche.
- Si presenta diabetes y está tomando insulina.
- Si presenta asma severa o algún tipo de alergia respiratoria que requiere de una terapia crónica o frecuente con administración de medicamentos
- Planes de exposición intensa a la luz solar o a sesiones de bronceado durante el periodo de estudio.
- Planes de baño en el mar, ir a la piscina o al sauna durante el estudio.
- Cualquier otra condición que el investigador considere pueda comprometer la evaluación del estudio.
- Historia de falta de adherencia o falta de disposición para adherirse al protocolo del estudio. (Bravo & Luque, 2010)

D. Lectura

Se evalúan los resultados de acuerdo a las siguientes escalas utilizadas por el Instituto Español de Experimentación clínica 2007.

Tabla 18. Escala de evaluación de eritema para test de irritabilidad

| ERITEMA | |
|---|----------|
| Ausencia de eritema | 0 |
| Eritema muy ligero (apenas visible) en al menos las 3/4 partes de la zona de aplicación, o bien visible en una superficie inferior | 1 |
| Eritema bien visible, repartido de manera uniforme en al menos las 3/4 partes de la zona de aplicación | 2 |
| Eritema importante (rojo oscuro) | 3 |
| Eritema purpúrico | 4 |

Nota: Eritema es un enrojecimiento de la piel

Fuente: Instituto Español de Experimentación Clínica, 2007

Tabla 19. Escala de evaluación de edema para test de Irritabilidad

| EDEMA | |
|--|----------|
| Ausencia de edema | 0 |
| Edema muy ligero y palpable en al menos las 3/4 de la zona de aplicación, o bien visible en una superficie inferior | 1 |
| Edema ligero (contornos netos bien definidos) en al menos las 3/4 de la zona de aplicación | 2 |
| Edema importante (espesor de un mínimo de 1 mm) en una superficie más grande que la zona de aplicación | 3 |

Nota: Edema es una hinchazón causada por la acumulación de líquido

Fuente: Instituto Español de Experimentación Clínica, 2007

Tabla 20. Escala de evaluación de ampollas para test de irritabilidad

| PÁPULAS/VESÍCULAS/AMPOLLAS/PÚSTULAS | |
|--|----------|
| Ausencia de pápulas, vesículas, ampollas, pústulas | 0 |
| Pápulas, o pequeñas vesículas (menos de 1 mm aproximadamente de diámetro) | 1 |
| Vesículas de 1 a 2 mm de diámetro | 2 |
| Pústulas | 3 |
| Ampollas con líquido claro | 4 |

Nota: Las pápulas, vesículas, ampollas y pústulas son lesiones de la piel que se presentan en un proceso inflamatorio

Fuente: Instituto Español de Experimentación Clínica, 2007

Tabla 21. Escala de evaluación de descamación para test de irritabilidad

| SEQUEDAD/DESCAMACIÓN | |
|--|----------|
| Ausencia de sequedad y de descamación | 0 |
| Ligera sequedad = aspecto mate, en al menos las 3/4 de la zona de aplicación. | 1 |
| Sequedad neta = aspecto pulverulento en al menos las 3/4 de la zona de aplicación. | 2 |
| Descamación moderada = aspecto de escamas en al menos 3/4 de la zona de aplicación. | 3 |
| Descamación importante = presencia de escamas espesas en al menos las 3/4 de la zona de aplicación. | 4 |

Nota: Descamación es el desprendimiento y la pérdida de la capa superficial de la epidermis

Fuente: Instituto Español de Experimentación Clínica, 2007

Tabla 22. Escala de evaluación de detergencia para test de irritabilidad

| EFEECTO DETERGENTE | |
|--|----------|
| Ausencia de rugosidad | 0 |
| Rugosidad ligera = aspecto ligeramente arrugado sobre al menos 3/4 de la zona de aplicación. | 1 |
| Rugosidad neta = aspecto neto de arrugado sobre al menos las 3/4 de la zona de aplicación, o muy arrugado (presencia de arrugas con crestas bien marcadas) sobre una superficie inferior a los 3/4 de la zona de aplicación | 2 |
| Rugosidad moderada = aspecto muy arrugado sobre al menos las 3/4 de la zona de aplicación, o presencia de arrugas profundas en una superficie inferior a los 3/4 de la zona de aplicación | 3 |
| Rugosidad importante = presencia de arrugas profundas en al menos las 3/4 de la zona de aplicación | 4 |

Nota: El efecto detergente en la piel es la presencia surcos o pliegues (arrugas) en la piel

Fuente: Instituto Español de Experimentación Clínica, 2007

Tabla 23. Escala de evaluación de reflectividad para test de irritabilidad

| REFLECTIVIDAD | |
|--|----------|
| Ausencia de reflectividad | 0 |
| Ligera reflectividad = aspecto ligeramente brillante en al menos las 3/4 de la zona de aplicación, o claramente brillante en una superficie inferior a los 3/4 de la zona de aplicación | 1 |
| Reflectividad neta = aspecto brillante en al menos las 3/4 de la zona de aplicación, o aspecto barniz en una superficie inferior a los 3/4 de la zona de aplicación | 2 |
| Reflectividad moderada = aspecto barniz en al menos las 3/4 de la zona de aplicación, o aspecto “helado” en una superficie inferior a los 3/4 de la zona de aplicación | 3 |
| Reflectividad importante = aspecto helado, fuertemente reluciente, en al menos las 3/4 de la zona de aplicación | 4 |

Nota: La reflectividad es el aspecto brillante que se presenta en la piel frente a un agente irritante.

Fuente: Instituto Español de Experimentación Clínica, 2007

Finalmente, se determinó el índice de Irritación Primaria Cutánea (I.P.C.), que es la media de la suma ponderada de las valoraciones obtenidas en el conjunto de (eritema "E", del edema "O", de la presencia de pápulas/vesículas/ampollas/ pústulas "P", de la sequedad/descamación "S", del efecto detergente "D" y de la reflectividad "R"):

$$I.P.C = \frac{1 \times \text{valoración } E + 2 \times \text{valoración } (O + P) + 0.5 \times \text{valoración } (S + D + R)}{\text{Número de panelistas}}$$

El índice de Irritación Primaria Cutánea permite clasificar al producto del modo siguiente:

Tabla 24. Clasificación del Índice de irritación primaria cutánea

| I.P.C | APLICACIÓN |
|---------------------|-------------------|
| 0 | Muy bien tolerado |
| >0 y ≤0,5 | Bien Tolerado |
| > 0,5 | Mal tolerado |

Nota: IPC: índice de irritación primaria cutánea

Fuente: Instituto Español de Experimentación Clínica, 2007

3.5.2 Procedimiento

Los parches fueron colocados en la superficie externa del brazo entre el hombro y el codo, con el brazo en posición relajada a un lado del cuerpo. Previo a la aplicación la piel se limpió con alcohol al 96%. Luego se aplicaron dos parches de papel filtro para análisis cualitativo de 1,5 cm x 1,5 cm; fijados en la piel con cinta adhesiva hipoalérgica, en uno de los parches se colocará la loción experimental A en una dosis de 0,02 ml aproximadamente y el otro será un parche solo (sin producto) como testigo negativo con un espacio mínimo entre los bordes de cada parche de 2 cm.

La forma de aplicación del parche de papel filtro se realizó desde la parte inferior presionando de abajo hacia arriba para que salga el aire. Una vez aplicado el parche, se realizó una presión con los dedos para que la loción se distribuya uniformemente y se apretó suavemente con la palma de la mano contra el brazo especialmente en las esquinas para asegurar una buena adherencia. Finalmente transcurridas las 48 horas el

parche se retiró y 30 minutos después se evaluaron los resultados de acuerdo a las escalas.

3.6 Evaluación de la actividad cosmética *in vivo*

La presente investigación fue de tipo instrumental, donde se empleó una metodología no invasiva utilizando un equipo de bioingeniería Visiopor PP34N®.

En primera instancia la dermatóloga, Dr. Marcela Paredes realizó una evaluación dermatológica a los adolescentes en edades entre 14 y 19 años del Colegio Fernando Ortiz Crespo y la Unidad Educativa Pedro Luis Calero de la parroquia de Zámiza; con el fin de identificar a los jóvenes que presentaban el tipo el de acné requerido para el estudio.

De los adolescentes diagnosticados con acné tipo II se escogieron a 20 que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión que se encuentran en el apartado 3.5.1 (literal B y C), la cantidad de voluntarios fue sugerida por los Claims de eficacia cosmética del laboratorio ECO OIL ARGENTINA S.A. (Pérez, 2010).

Antes de iniciar el estudio los voluntarios llenaron una ficha con sus datos personales y antecedentes clínicos (Anexo 12) y sus padres firmaron una carta consentimiento (Anexo 13) aprobando la participación de los estudiantes en el estudio.

3.6.1 Disposiciones generales de análisis

A. Reactivos

Loción experimental

B. Lectura

El equipo Visiopor PP34® cuantifica el número de porfirinas por cm², y mediante un análisis matemático se determina la disminución de porfirinas lo que indica la disminución de *P. acnes*

3.6.2 Equipos

Tabla 25. Equipos utilizados

| Equipo | Marca | Modelo |
|----------------------------|-----------------------------------|---------------|
| Visiopor | Courage + Khazaka electronic GmbH | PP34N® |
| Computador portátil | Sony | |

Nota: Descripción de los equipos utilizados en el laboratorio de la Universidad Salesiana

Elaborado por: Victoria Pumisacho

3.6.3 Procedimiento

A cada participante se le proporcionó 25 ml del jabón líquido neutro y una toalla, para lavarse el rostro; luego se procedió a realizar una lectura inicial en la parte central de la frente de cada uno de los voluntarios; con la ayuda del equipo Visiopor PP34N® antes del uso de la loción.

Se aplicó la loción señalando que no se laven el rostro hasta después de 24 horas, luego se tomó una segunda lectura; según los Claims de eficacia cosmética del laboratorio ECO OIL ARGENTINA S.A. transcurrido este tiempo ya se puede registrar el efecto de la formulación (Pérez, 2010), se aplicó nuevamente la loción y al cabo de otras 24 horas se realizó la última lectura, todas estas lecturas se efectuaron en el mismo lugar, y en el software se registraron los datos y las fotografías de cada paciente. Finalmente, se tabularon los datos en función de la disminución del porcentaje de porfirinas generadas por *P. acnes*.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Determinación *in vitro* de la concentración en la cual *L. acidophilus* ATCC® 4356 es antagonista de *P. acnes* ATCC®11827

Los resultados que se obtuvieron al realizar el estudio de efecto antagónico de *L. acidophilus* por el método de Anukool, están en función de la interpretación de los halos obtenidos y del análisis estadístico.

Tabla 26. Halos de inhibición *L. acidophilus* ATCC® 4356 frente a *P. acnes* ATCC®11827

| Concentración de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ufc/ml) | Halos de inhibición (mm) | | | | Promedio de los halos de inhibición (mm) | Zona de inhibición (halo de inhibición –disco de antibiograma) (mm) |
|--|--------------------------|------|------|------|--|---|
| | Número de repeticiones | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | | |
| 1×10^8 | 10.2 | 10 | 9.6 | 9.4 | 9.8 | 3.8 |
| 1×10^7 | 6.6 | 6.5 | 6.2 | 6 | 6.3 | 0.3 |
| 1×10^6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 0 |
| BP | 39.1 | 37.1 | 36.8 | 36.6 | 37.4 | 31.4 |
| BN | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 0 |

Nota: BP: Blanco positivo; BN: Blanco negativo.

Elaborado por: Victoria Pumisacho

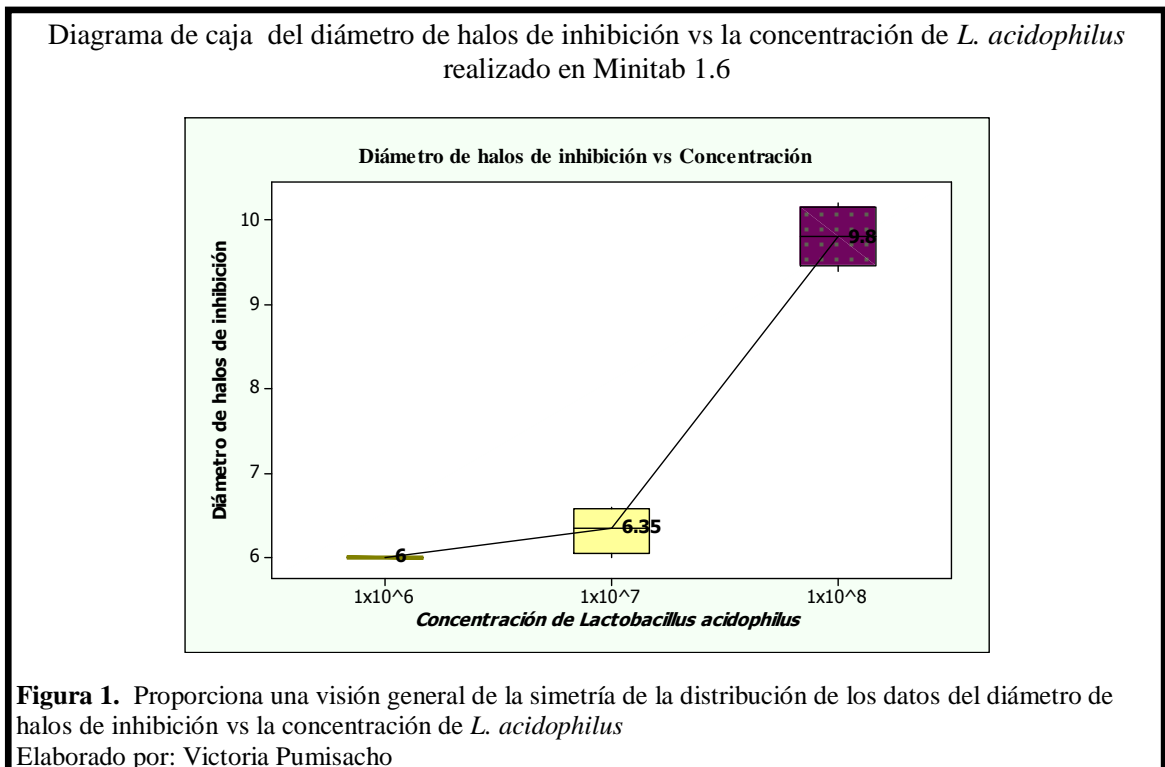
Se utilizó como blanco negativo agua estéril y un antibiótico (Tetraciclina) como blanco positivo.

De acuerdo a los resultados el *L. acidophilus* muestra cierta tendencia a inhibir el patógeno desde una concentración de 1×10^7 ufc/ml, sin embargo la concentración que presenta mayor actividad inhibitoria es 1×10^8 ufc/ml que presenta una zona de

inhibición mayor a 1 mm alrededor del disco lo que se determinó como efecto antagónico positivo (Ramírez, 2005).

El efecto antagónico obtenido frente a *P. acnes* (bacteria Gram-positiva) es menor al esperado con respecto a la inhibición obtenida en diversos estudios frente a otros microorganismos patógenos, esto puede ser porque las bacterias lácticas ejercen mayor actividad antagónica frente a bacterias Gram negativas que frente a bacterias Gram positivas, fundamentan porque las bacterias Gram negativas contienen aparte de la pared celular una membrana externa que contiene fosfolípidos, lipopolisacáridos y proteínas que la atraviesan en todo su espesor y que delimitan poros hidrófilos que permiten el paso de sustancias de bajo peso molecular por lo que la sensibilidad es diferente (Prescott, Harley, & Klein, 1999).

4.1.1 Análisis estadístico de los halos de inhibición generados por *L. acidophilus* ATCC® 4356



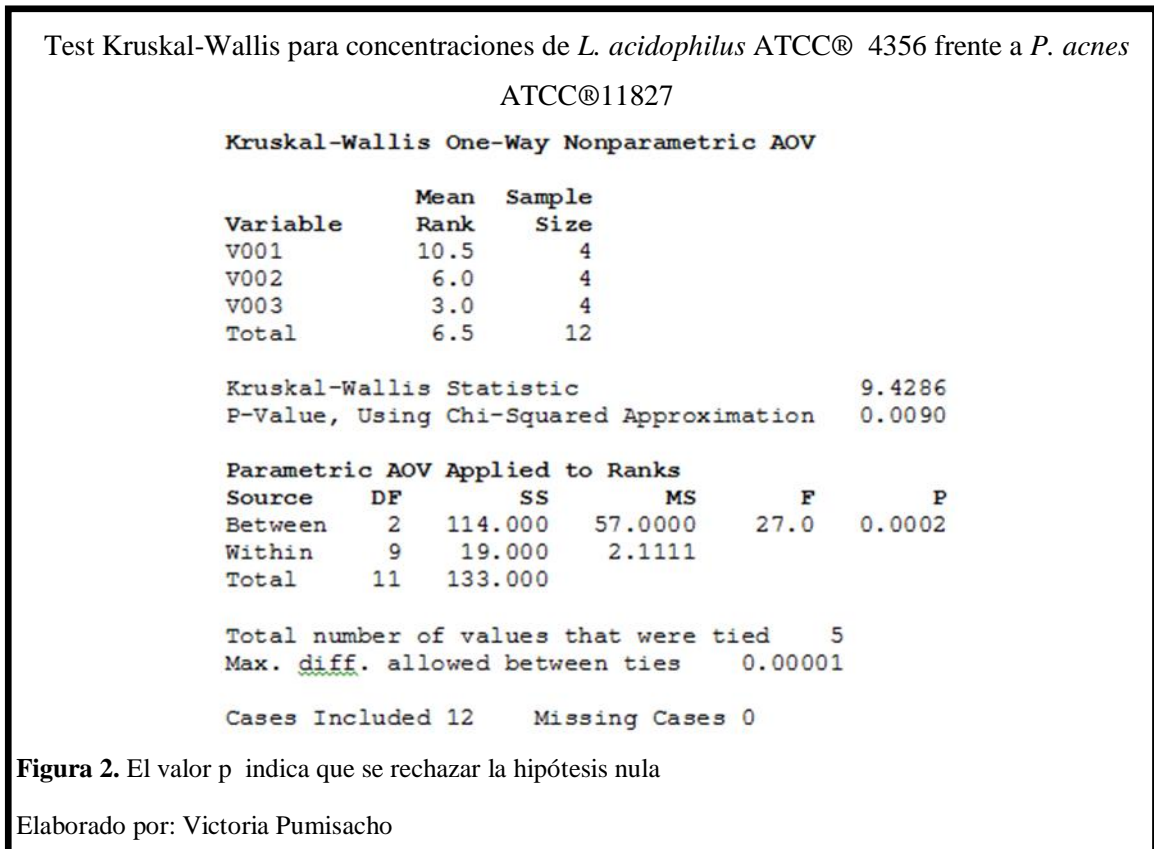
La gráfica de caja muestra:

La mediana de la concentración 1×10^8 es 9.8, y el rango intercuartil es de 0.7

La mediana de la concentración 1×10^7 es 6.35, y el rango intercuartil es de 0.52

La mediana de la concentración 1×10^6 es 6, y el rango intercuartil es de 0

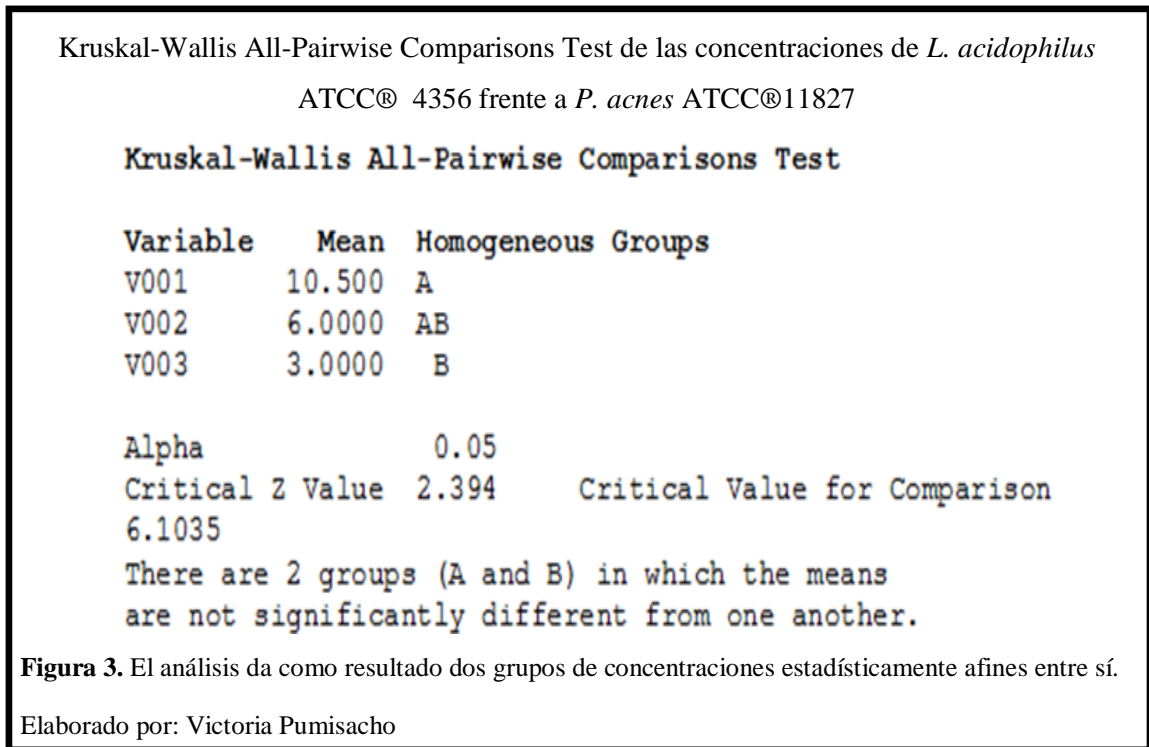
La línea de tendencia va en ascenso desde la concentración 1×10^6 hasta la concentración 1×10^8 , lo que indica que mientras menor es la concentración de *L. acidophilus* menor es el diámetro del halo de inhibición.



Se halló un valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) de 9.4286 y un valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) de 0.0090.

Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es menor al alfa escogido, 0.05; se acepta la hipótesis alternativa, por lo que se concluye que al menos una de las concentraciones de *L. acidophilus* tiene medianas diferentes.

Para determinar cuál de las concentraciones causa la diferencia de los halos, se realizó una prueba a posteriori en la que se comparan las medianas de todos los pares posibles de concentraciones (Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test), de la cual se obtuvieron los siguientes resultados que se observan en la figura 3.



De acuerdo a los resultados de la figura 3, los dos grupos son: grupo A: 1×10^8 ufc/ml, 1×10^7 ufc/ml y grupo B: 1×10^7 ufc/ml, 1×10^6 ufc/ml.

La concentración que sobresale de los dos grupos que se formaron, es la de 1×10^8 ufc/ml debido a que tiene un rango de medianas más alto (10.500). Por lo que se concluye que presenta los mejores halos de inhibición.

4.2 Evaluación *in vitro* el efecto antagónico de las lociones elaboradas con *L. acidophilus* ATCC® 4356 sobre *P. acnes* ATCC®11827.

Tabla 27. Diámetro de halos de inhibición de la loción A frente a *P. acnes* ATCC®11827

| | Halos de inhibición (mm) | | | |
|-----------------|--------------------------|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Loción A | 9.8 | 9.6 | 9.6 | 9.3 |
| BN | 6 | 6 | 6 | 6 |

Nota: BN: Blanco negativo (Loción A sin *L. acidophilus*)

Elaborado por: Victoria Pumisacho

Se evidencia que la loción A presenta halos de inhibición, de un valor promedio de 9.6 mm. En contraste, a su blanco negativo que no presenta ningún halo inhibición, esto debido a que no posee ningún excipiente con actividad inhibitoria; lo que demuestra evidentemente que el *L. acidophilus* es la sustancia que inhibe el crecimiento de la bacteria.

Tabla 28. Halos de inhibición la loción B frente a *P. acnes* ATCC®11827

| | Halos de inhibición (mm) | | | |
|-----------------|--------------------------|-----|-----|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Loción B | 8.9 | 8.7 | 8.3 | 8 |
| BN | 6 | 6 | 6 | 6 |

Nota: BN: Blanco negativo (Loción B sin *L. acidophilus*)

Elaborado por: Victoria Pumisacho

La loción B presenta halos de inhibición, de un valor promedio de 8.5 mm que es menor al valor promedio de halos de inhibición de la loción A. El blanco negativo no presenta ningún halo inhibición.

Tabla 29. Halos de inhibición la loción C frente a *P. acnes* ATCC®11827

| | Halos de inhibición (mm) | | | |
|----------|--------------------------|-----|---|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Loción C | 8.6 | 8.4 | 8 | 7.6 |
| BN | 6 | 6 | 6 | 6 |

Nota: BN: Blanco negativo (Loción C sin *L. acidophilus*)

Elaborado por: Victoria Pumisacho

La loción C presenta un valor promedio de halos de inhibición, de 8.2 mm que es muy similar al promedio de la loción B. El blanco negativo no presenta ningún halo inhibición, lo que significa que el *L. acidophilus* es el que inhibe el crecimiento de la bacteria patógena.

Tabla 30. Halos de inhibición la loción D frente a *P. acnes* ATCC®11827

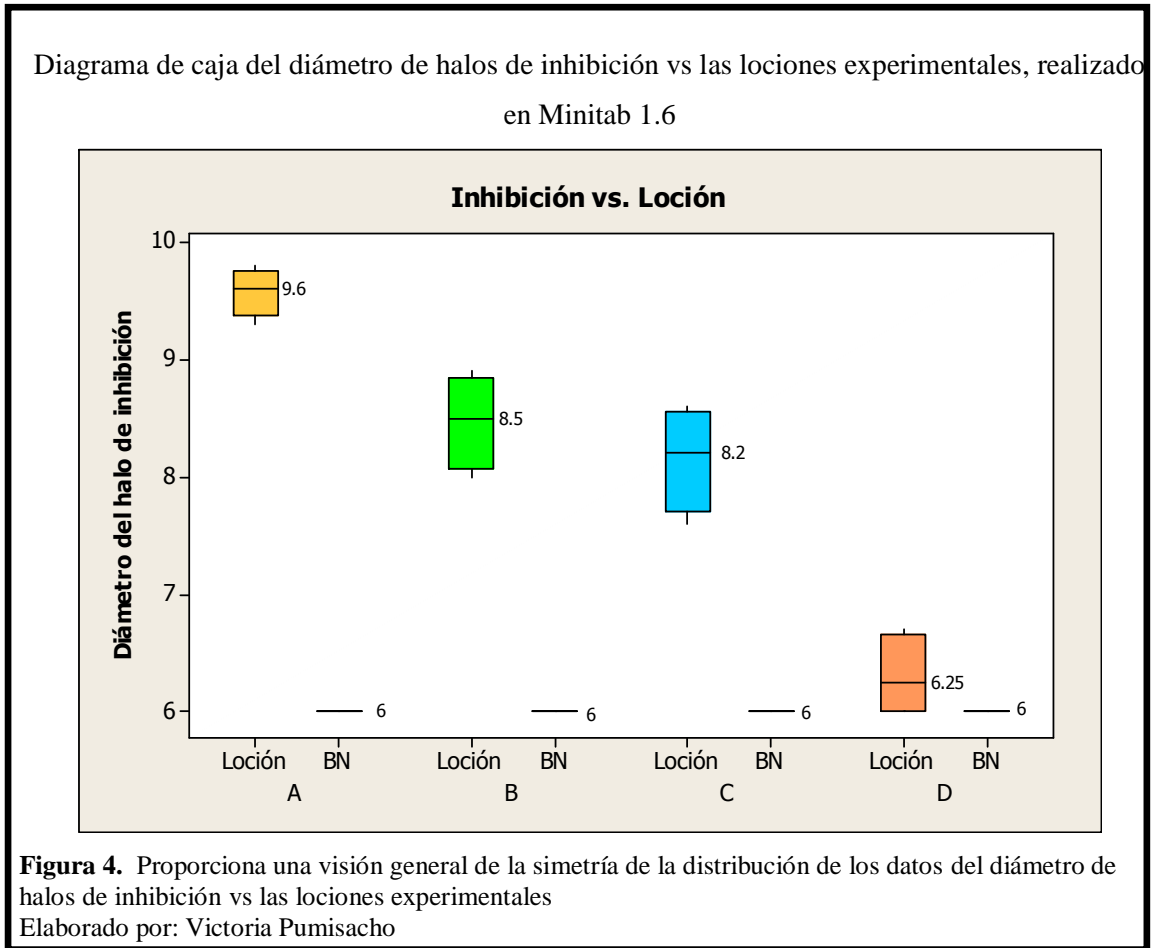
| | Halos de inhibición (mm) | | | |
|----------|--------------------------|-----|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Loción D | 6.7 | 6.5 | 6 | 6 |
| BN | 6 | 6 | 6 | 6 |

Nota: BN: Blanco negativo (Loción D sin *L. acidophilus*)

Elaborado por: Victoria Pumisacho

Se observa que la loción D presenta halos de inhibición, de un valor promedio de 6.3 mm siendo el menor valor entre las cuatro lociones. El blanco negativo no presenta ningún halo inhibición frente a *P. acnes*.

4.2.1 Análisis estadístico de los halos de inhibición generados por las lociones formuladas

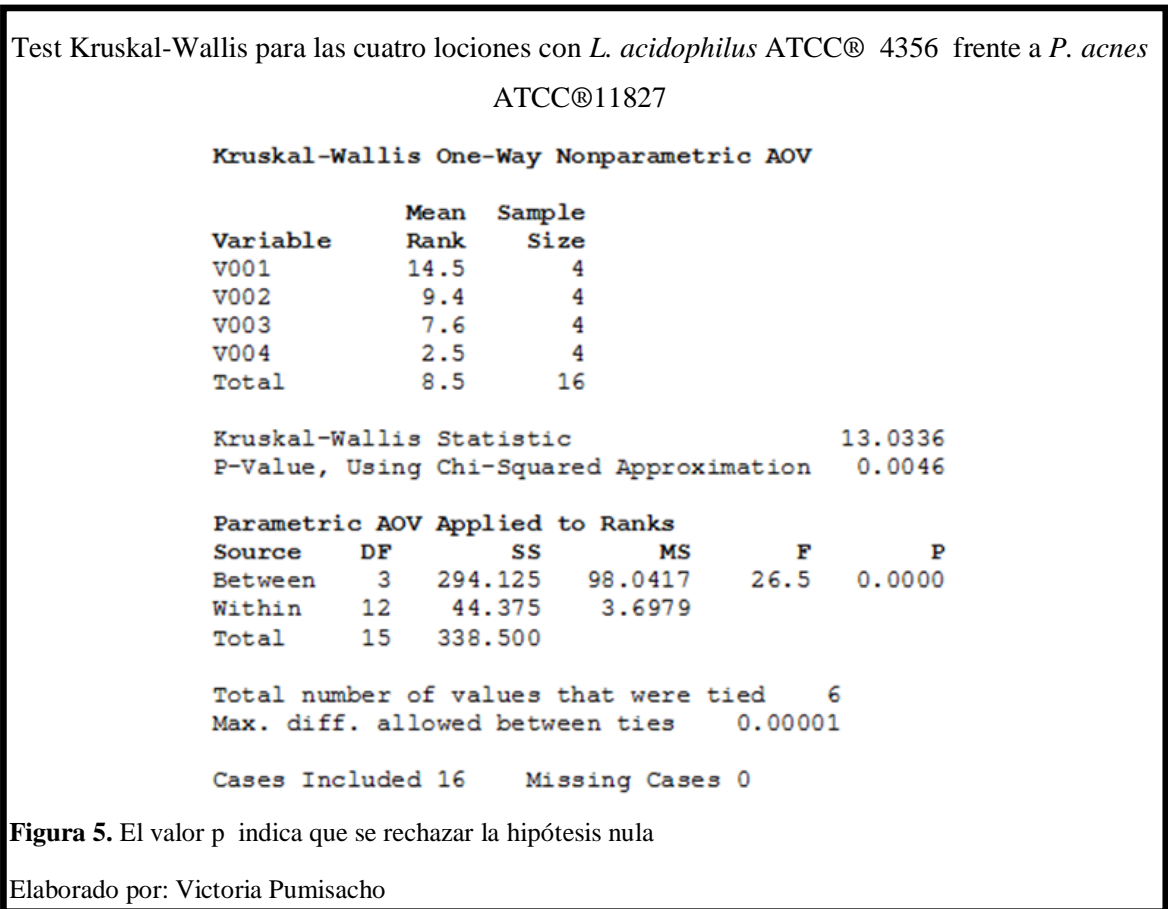


La mediana de diámetro del halo de inhibición es más alta para loción A (9.6), esta loción también demuestra la menor variabilidad, con un rango intercuartil de 0,37. Además, la distribución tiene una asimetría negativa.

Las lociones B y C tienen medianas de diámetro de halos de inhibición similares (8.5 y 8.2, respectivamente). Además la loción C también muestra la mayor variabilidad, con un rango intercuartil de 0.85.

La mediana de diámetro de halos de inhibición de loción D es solamente 6.25 con un rango intercuartil de 0.65.

Las medianas de los BN de cada una de las lociones es 6 lo que indica no existe ningún tipo de inhibición.



El valor del estadístico de Kruskal-Wallis (H) que se encontró fue de 13.0336, y el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) fue de 0.0046. El valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es menor al alfa escogido (0.05); por tal razón, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que al menos una de las lociones está generando un halo de inhibición diferente a los demás.

Para determinar la loción que está generando halos de inhibición diferentes, se realizó una prueba a posteriori en la que se comparan las medianas de todos los pares posibles de lociones (Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test), de la cual se obtuvieron los siguientes resultados que se observan en la figura 5.

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test las cuatro lociones con *L. acidophilus* ATCC® 4356 frente a *P. acnes* ATCC®11827

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test

| Variable | Mean | Homogeneous Groups |
|----------|--------|--------------------|
| V001 | 14.500 | A |
| V002 | 9.3750 | AB |
| V003 | 7.6250 | AB |
| V004 | 2.5000 | B |

Alpha 0.05
 Critical Z Value 2.638 Critical Value for Comparison 8.8817
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Figura 6. El análisis da como resultado dos grupos de concentraciones estadísticamente afines entre sí
 Elaborado por: Victoria Pumisacho

De acuerdo a los resultados de la figura 6, los dos grupos son: grupo A: loción A, loción B, loción C y grupo B: loción B, loción C, loción D.

Comparando los grupos, se observa que la loción con el mayor rango de medianas es la loción A con un rango de medianas de 14.500, considerándose el de mayor efecto antagónico; por lo cual se la utilizó en el estudio de actividad cosmética *in vivo*.

4.2.2 Control de calidad de la loción

Tabla 31. Resultados del análisis organoléptico de la loción.

| ANÁLISIS | RESULTADOS |
|----------------|--|
| Color | Amarillo tenue |
| Olor | Característico de los metabolitos producidas por la bacteria |
| Textura | Acuosa |

Nota: El análisis organoléptico se realizó a través de los órganos sensoriales externos
 Elaborado por: Victoria Pumisacho

Tabla 32. Resultados del análisis físico – químico de la loción A.

| ANÁLISIS | RESULTADOS |
|----------|------------|
| pH | 6 |

Nota: La loción elaborada no tiene estándares de referencia, dentro de una regulación nacional
Elaborado por: Victoria Pumisacho

Estos análisis permiten determinar los parámetros de calidad de la loción.

El valor de pH es 6 encontrándose dentro de los estándares de tecnología cosmética, y estando acorde con el rango de pH normal de la piel que va desde 5.5 a 6.5, puesto que, al ser ligeramente ácido no ataca al tejido cutáneo y no causa trastornos en la piel (Vásquez, 2008).

El valor de pH de la loción tampoco interfiere con el desarrollo del *L. acidophilus*, puesto que es afín con sus rangos de pH de 3.5 a 7.5 (Garcés, 2003).

4.3 Test de irritabilidad de la loción

Después de la aplicación única de la loción formulada con una concentración de 1×10^8 ufc/ml de *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356 bajo un parche oclusivo sobre la piel del antebrazo, durante 48 horas consecutivas en 40 voluntarios adultos, se procedió con la evaluación macroscópica de las siguientes reacciones: eritema (E), edema (O), reflectividad (R), pápulas/vesículas/ampollas/ pústulas (P), sequedad/descamación (S) y detergencia (D), cada una con su respectiva escala de evaluación detallada en el apartado 3.5.1 literal D.

Tabla 33. Datos obtenidos en el test de irritabilidad

| Voluntarios aceptados para evaluación | | Loción | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|-------------------------|---------|-------|---------|----------|-------------|---------------|---------|-------|---------|----------|-------------|---------------|
| | | A | | | | | | BN | | | | | |
| | | Eritema | Edema | Ampolla | Sequedad | Detergencia | Reflectividad | Eritema | Edema | Ampolla | Sequedad | Detergencia | Reflectividad |
| 1 | Altamirano Freddy | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | Aucapiña Cristina | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | Banda Vanesa | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | Buñay Paulina | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | Bustos Krupsicaya | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | Cacuango Jenny | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | Cadena Veronica | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | Caicedo Sughey | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | Carrera Ángel | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | Castañeda Edgar | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | Chicaiza Tatiana | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | Collaguazo Cristina | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | Contento Elena | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | Cuenca Paul | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | Cueva Joselyn | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | Garzón Lorena | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | Gómez Manuel Esteban | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | Gortaire Gabriela | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | Guayasamin Evelyn | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | Gutiérrez Diana | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | Hoyos Franciso | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | Lema Cristian | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | Lincango Richard | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | Lozano Johana | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | Molina Lisbeth | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | Montalvo Yanira | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | Muñoz Cristian | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | Paucar Danilo | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 29 | Pérez Solange | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | Regalado Daniel | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 31 | Rojas Danny | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 32 | Rueda Nelson | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 33 | Sarzosa Ana | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | Secaira Laura | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 35 | Siguencia Lenin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 36 | Silva Aracely | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 37 | Tapia Dayanara | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 38 | Valencia María Fernanda | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 39 | Valladares Priscila | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 40 | Vásquez Katherine | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Nota: Se muestra la evaluación dérmica realizada a cada uno de los voluntarios

Elaborado por: Victoria Pumisacho

Una vez obtenidos los valores individuales de cada voluntario con respecto a las reacciones producidas por las lociones ensayadas, se obtuvo el Índice de Irritación Primaria Cutánea (I.P.C.) mediante la fórmula indicada en el apartado 3.5.1 literal D.

Tabla 34. Índice de irritación primaria cutánea de la loción A.

| LOCIÓN | I.P.C | APLICACIÓN |
|--------|-------|---------------|
| A | 0.19 | Bien tolerado |

Nota: El valor de del I.P.C. indica que el cosmético será bien tolerado por la piel.

Elaborado por: Victoria Pumisacho

Los I.P.C. de las lociones en estudio están entre >0 y $\leq 0,5$, por lo que son calificadas como bien toleradas (Ver en el Apartado 3.5.1 literal D). Esto demuestra que la loción no produce una reacción significativa de irritación debido a una intolerancia cutánea, por lo que puede ser utilizada con seguridad en el estudio de eficacia *in vivo*.

4.4 Estudio de actividad cosmética instrumental

4.4.1 Evaluación dermatológica

En cada una de las instituciones educativas en las cuales se desarrolló el estudio, la dermatóloga Dra. Marcela Paredes determinó que adolescentes presentaban acné y que tipo de acné padecían.

Porcentaje de adolescentes con acné tipo I,II y III

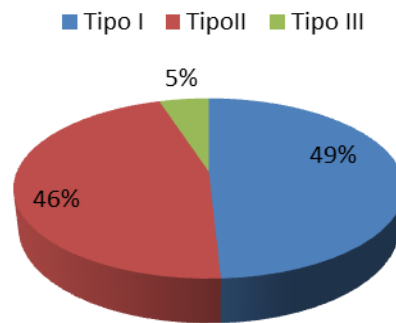


Figura 7. Indica los valores porcentuales de adolescentes con acné tipo I, II y III, en la muestra de estudio

Elaborado por: Victoria Pumisacho

La categorización dermatológica fue realizada en función de las características que identifican a cada tipo de acné, en casos de acné tipo I se observó la presencia de comedones abiertos, mientras que en acné tipo II se pudo visualizar comedones, pápulas y pústulas y acné tipo III. La figura 7 muestra que el 49% del total de adolescentes evaluados presentaron acné tipo I, el 46% acné tipo II y el 5% presentaron acné tipo III.

Del 46% que presentaron acné tipo II se escogieron aleatoriamente los 20 adolescentes que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión y participaron en el estudio.

Porcentaje de hombres y mujeres con acné

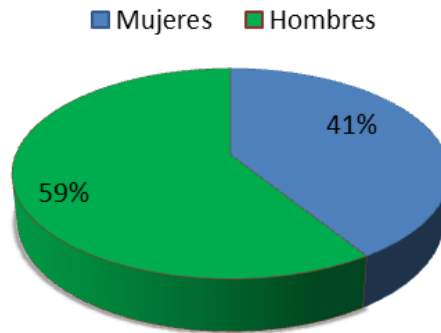


Figura 8. Indica los valores porcentuales de los hombres y mujeres con presencia de acné en la muestra de estudio

Elaborado por: Victoria Pumisacho

La figura 8 indica que del total de adolescentes evaluados en las dos instituciones el 59% fueron hombres, mientras que, el 41% mujeres; el porcentaje de hombres con acné fue mayor en un 18% sobre el porcentaje de mujeres con acné.

Porcentaje de adolescentes con acné vs edad

■ 14-15 años ■ 15-16 años ■ 16-17 años ■ 17-18 años ■ 18-19 años

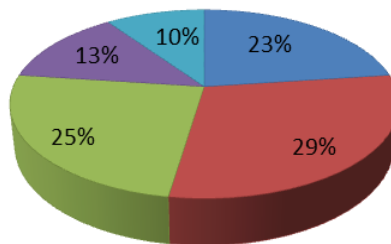


Figura 9. Indica los valores porcentuales de los adolescentes con presencia de acné vs su edad en la muestra de estudio.

Elaborado por: Victoria Pumisacho

La figura 9 indica que del total de adolescentes evaluados en las dos instituciones hay más casos de acné (29%) en edades entre 15-16 años, y menos casos (3%) en edades entre 18- 19 años.

4.4.2 Evaluación instrumental

Tras la aplicación puntual de la loción A en las lesiones de acné durante 2 días consecutivos, se cuantificó la cantidad de porfirinas al inicio, 24 horas después y al final del estudio en voluntarios adolescentes con la ayuda del equipo Visiopor PP34N®.

Tabla 35. Porcentaje de disminución de porfirinas generadas por *P. acnes* después de la aplicación de la loción A.

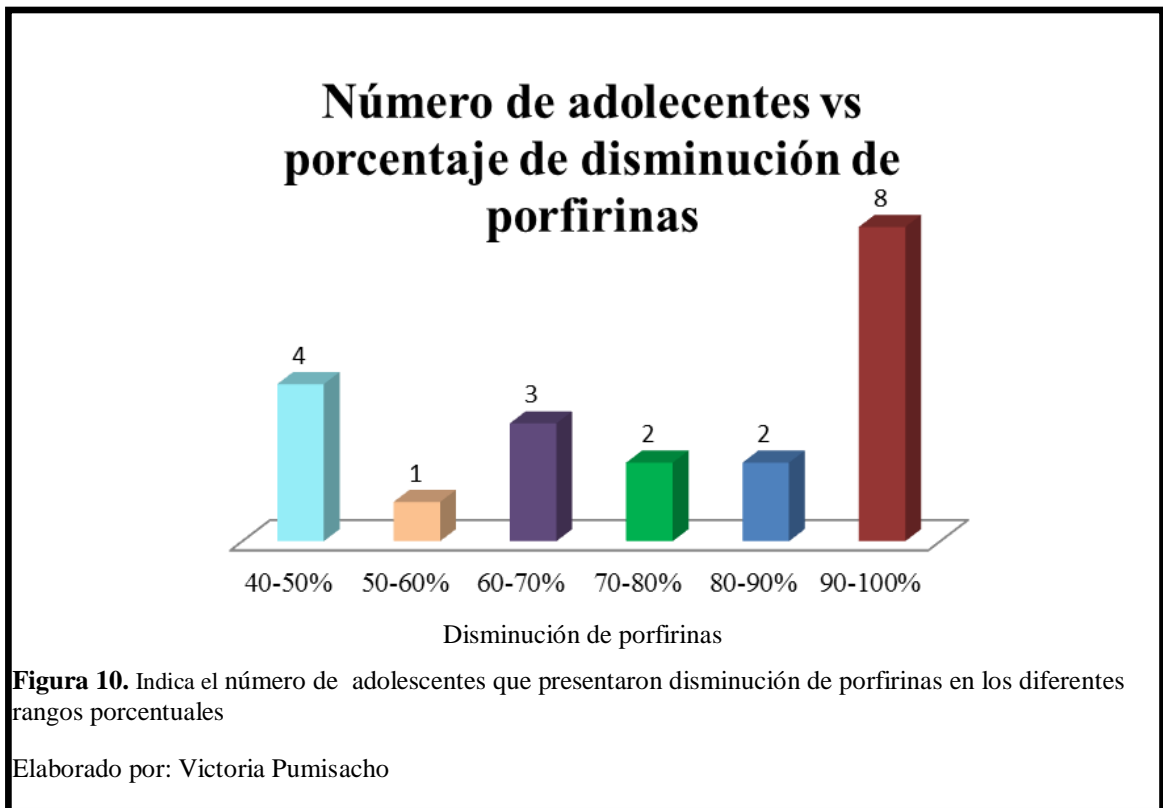
| PORCENTAJE DE DISMINUCION DE PORFIRINAS | | | | | | |
|---|---------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---|---------------------------|--------------------------------|
| No. | VOLUNTARIOS | EVALUACION INICIAL (No. porfirinas) | EVALUACION A LAS 24H (No. porfirinas) | EVALUACION FINAL A LAS 48H (No. porfirinas) | DISMINUCION DE PORFIRINAS | % DE DISMINUCION DE PORFIRINAS |
| 1 | Arias Estefania | 7 | 5 | 3 | 4 | 57.1 |
| 2 | Cedeño Bryan | 2 | 0 | 0 | 2 | 100 |
| 3 | Chorlango Ana Lucia | 8 | 4 | 2 | 6 | 75 |
| 4 | Escobar Carol | 11 | 8 | 3 | 8 | 72.7 |
| 5 | Escobar Kevin | 22 | 14 | 12 | 10 | 45.5 |
| 6 | Garcés Edwin | 8 | 5 | 3 | 5 | 62.5 |
| 7 | Garofalo Fredy | 4 | 3 | 2 | 2 | 50 |
| 8 | Guañuna Ramiro | 7 | 4 | 0 | 7 | 100 |
| 9 | Guzmán Fernanda | 8 | 4 | 1 | 7 | 87.5 |
| 10 | Isa Kevin | 16 | 4 | 2 | 14 | 87.5 |
| 11 | Lemache Paola | 3 | 2 | 1 | 2 | 66.7 |
| 12 | Loor Jonathan | 1 | 0 | 0 | 1 | 100 |
| 13 | Menta Melani | 2 | 1 | 1 | 1 | 50 |
| 14 | Morales Javier | 4 | 4 | 2 | 2 | 50 |
| 15 | Ocaña Jessica | 21 | 14 | 7 | 14 | 66.7 |
| 16 | Pilatuña Estalin | 5 | 3 | 0 | 5 | 100 |
| 17 | Pilco Jennifer | 13 | 8 | 0 | 13 | 100 |
| 18 | Robles José | 1 | 1 | 0 | 1 | 100 |
| 19 | Simbaña Daniela | 1 | 0 | 0 | 1 | 100 |
| 20 | Vicente Paul | 21 | 16 | 1 | 20 | 95.2 |
| | | | | | | 78.3 |

Nota: Valores porcentuales de la disminución de porfirinas de cada voluntario

Elaborado por: Victoria Pumisacho

En la Tabla No. 35 se muestra que existe disminución de porfirinas desde la primera aplicación de la loción formulada, después de las 48 horas de aplicación se obtuvo una

disminución máxima del 100%, y una mínima del 45.5%, y un promedio total de 78.3%, lo que indica que la loción A tiene efecto antagónico contra *P. acnes in vivo*.



Como se muestra en la figura 10, todos los adolescentes del estudio mostraron una disminución de porfirinas superior al 40%. De los 20 individuos 8 presentaron mayor porcentaje de disminución en un rango de 90% - 100%.

CONCLUSIONES

- Se concluye que a mayor concentración de *L. acidophilus* existe mayor capacidad antagónica *in vitro* frente a *P. acnes*, esto se determinó al obtener mayor inhibición del patógeno a una concentración 1×10^8 ufc/ml y ningún tipo de inhibición a una concentración 1×10^6 ufc/ml.
- De las cuatro lociones evaluadas (A, B, C, D) la que presentó mayor actividad antagónica *in vitro* frente a *P. acnes*, fue la loción A, mientras la loción D registró la menor inhibición, por lo que se observa que las alta concentración de carboximetilcelulosa y glicerina atenúan la actividad antagónica del *L. acidophilus*.
- Se comprobó que el único compuesto responsable de la actividad antagónica en las lociones es el *L. acidophilus*, ya que los blancos negativos no reportaron ningún tipo de inhibición.
- De las cuatro lociones experimentales, la loción A fue escogida para realizar el estudio de irritabilidad y el estudio *in vivo* de actividad cosmética, por ser la loción con mayor actividad antagónica *in vitro*.
- El valor de pH de la loción A va acorde con el pH normal de piel por lo que no causo ningún tipo de daño en la piel. A su vez no influyó con el desarrollo normal de la bacteria láctica dentro de la formulación.
- Se demostró que la loción A es “bien tolerada”, ya que, su índice de irritación primaria cutánea es 0.19, es decir, no provocaron ninguna reacción alérgica en la zona de la piel testeada y por tanto es inocua al contacto dérmico.
- Se comprobó que la loción A posee actividad antagónica contra *P. acnes in vivo*, al obtener un promedio total de disminución de porfirinas del 78,3 %, lo que

implica disminución de la población de *P. acnes*, ya que, son directamente proporcionales.

- Concluida la investigación sobre el antagonismo del *L. acidophilus* en la loción formulada, se afirma la hipótesis alternativa, ya que, existe inhibición *in vitro* e *in vivo* contra *P. acnes*, principal bacteria causante del acné.

RECOMENDACIONES

Como recomendaciones para la elaboración de futuros trabajos de grado o investigaciones en torno al antagonismo de bacterias se recomienda:

- Realizar estudios más profundos de los compuestos inhibitorios involucrados en la actividad antagónica de *Lactobacillus acidophilus*, ya que es un microorganismo con más propiedades por descubrir e investigar.
- Probar otras alternativas de adición de bacterias lácticas en las formulaciones cosméticas, como por ejemplo la fermentación o la liofilización.
- Adicionar algunos excipientes que podrían mejorar las características organolépticas y físico-químicas de las formulaciones considerando que en este estudio se utilizó una mínima cantidad de excipientes para no producir interferencia y comprobar únicamente la actividad del *Lactobacillus acidophilus*.
- Realizar estudios para establecer el tiempo de vida útil de la loción, con el fin de ajustarlo a las condiciones deseadas para su utilización en un tratamiento.

LISTA DE REFERENCIAS

- Al-Ghazzewi, F. H., & Tester, R. F. (2010). Effect of konjac glucomannan hydrolysates and probiotics on the growth of the skin bacterium *Propionibacterium acnes* in vitro. *International Journal of Cosmetic Science*, 139–142.
- Álvarez, E. (2011). *Efectos del Lactobacillus casei ATCC 393 sobre el Escherichia coli durante la vida comercial del queso fresco*. Universidad Nacional el Callao.
- ANVISA. (2005). *Guía de estabilidad de productos cosméticos*. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria , Brasilia .
- Axelsson, L. (1998). *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Botica Magistral. (1994). *Farmacia de Preparaciones Magistrales* . Recuperado el 03 de mayo de 2013, de http://www.botica.com.py/informes/images/2/21/Vade_Dermatologia.pdf
- Bravo, C., & Luque, J. (2010). *Estudio clínico doble ciego controlado para determinar la capacidad potencial de producir irritación primaria o acumulativa y/o sensibilización alérgica por contacto de una crema reductora de estrías (BEL-0300509)*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Brook, I. (1999). Bacterial interference. *Critical Reviews in Microbiology*, 25(3), 155-72.
- BVA scientific. (2011). *Tryptic Soy Agar*. Recuperado el 25 de Noviembre de 2013, de <http://www.bvascientific.com/Customervbvasci/customerpages/specpages/236920.pdf>
- Carbajo, J. (2010). *Eficacia e inocuidad cutánea* . Recuperado el 01 de Mayo de 2013, de Portalfarma:
[http://pfarmamx1.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000019.nsf/0/3F636FE41134F3D8C12574E40041A709/\\$FILE/PON_J05_FCarbajo%20Espejo.pdf](http://pfarmamx1.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000019.nsf/0/3F636FE41134F3D8C12574E40041A709/$FILE/PON_J05_FCarbajo%20Espejo.pdf)
- Carr, Chill, & Maida. (2002). The lactic acid bacterias: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 281-370.
- CDC de Bio Basic Europe S.r.l. (2002). *Bio Basic Europe*. Recuperado el 15 de Marzo de 2013, de http://www.biobasiceurope.it/es/studi-efficacia-vivo.asp#PATCH_TEST

- CK electronic. (2012). *Courage + Khazaka electronic GmbH*. Recuperado el 22 de Noviembre de 2013, de Visiopor® PP 34 N: <http://www.courage-khazaka.de/index.php/en/products/dermatology/257-visiopor-2>
- Claude, M. (2005). *Introducción a la dermatofarmacología y a la cosmetología*. España: Acribia, S.A.
- Collins, J., Thornton, G., & Sullivan, G. (01 de Mayo de 1998). Selection of Probiotic Strains for Human Applications. (Elsevier, Ed.) *International Dairy Journal*, 8(5), 487-490.
- Cores, A., Álvarez, S., & De la Roz, M. (2011). *Bacilos Gram positivos*. Recuperado el 30 de Abril de 2012, de <http://microral.wikispaces.com/14.+Bacilos+Gram+positivos>.
- CYTED. (1995). *Manual de técnicas de investigación, programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo, subprograma X. Química fina Farmacéutica proyecto X-Búsqueda de principios bioactivos en plantas medicinales de la región*. Bogotá.
- De Bem, R. (2007). *ABC DE LA SALUD*. Recuperado el 15 de mayo de 2013, de <http://www.abcdelasalud.net/391/dermatologia/acne/>
- Del Cañizo, C. (2005). La evaluación de la actividad de los cosméticos . *Medicina Cutánea Ibero Latino Amamericana* , 33(3), 135-141.
- Di Marzio, L., Cinque, B., De Simone, C., & Cifone, M. (Octubre de 2003). Effect of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* on ceramide levels in human keratinocytes in vitro and stratum corneum in vivo. *Experimental Dermatology*, 12(5), 615–620.
- Díaz, G. (2009). *Scribd*. Recuperado el 05 de Mayo de 2013, de Fundamentos y técnicas de análisis microbiológico: <http://es.scribd.com/doc/53031182/Antibiograma-Pruebas-de-susceptibilidad-antimicrobiana>
- European Bioinformatics Institute, E. (2002). *UniProt*. Recuperado el 15 de Diciembre de 2013, de www.ebi.ac
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2010). *EUCAST*. Recuperado el 25 de Enero de 2014, de http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Spain/EUCAST_metodo_de_difusion_con_discosv1_1-Spanish.pdf

- Franco, G. N. (2003). Histología de la piel. *UNAM*, 130-133.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 365–378.
- Gamazo, C., López-Goñi, I., & Díaz, R. (2005). *Manual práctico de Microbiología*. Barcelona: MASSON S.A.
- Ganazo, C., López, I., & Díaz, R. (2000). *Manual Práctico de Microbiología* (3 ed.). Barcelona: Masson S.A.
- Garcés, F. (2003). *Modelamiento del efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento y producción de sustancias inhibitorias de bacterias del Lactobacillus acidophilus*. Universidad de la Sabana, Bogotá.
- García, M. (2011). *Medicopedia*. Recuperado el 23 de Enero de 2014, de Bacterioterapia: http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Bacterioterapia
- Getha, K., & Vikineswary, S. (2002). Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, 28, 303-310.
- Gómez, C. (Marzo de 2003). *Centro de informacion de medicamentos*. Recuperado el 29 de Abril de 2012, de El acné y su tratamiento : <http://sibdi.ucr.ac.cr/CIMED/cimed10.pdf>
- Gómez, G., & Molina, W. (2012). Tratamiento del acné. *Revista medica de costa rica y centroamerica lxxix*, 91-97.
- Gonzales, A. (1997). *Wikispaces*. (U. d. Oviedo, Ed.) Recuperado el 13 de Enero de 2013, de Bacilos Gram Positivos: <http://microral.wikispaces.com/Bacilos+Gram+positivos>
- Hernández, C., Pantoja, L., & Turriago, S. (2002). *Evaluación de la presencia de bacteriocinas en cultivos de bacterias ácido lácticas*. Universidad de la Sabana, Bogotá.
- Instituto Español de Experimentación Clínica. (2007). *Estudio de compatibilidad: Patch test simple y unico*. Barcelona.
- Juvé, A., Viscasillas, A., & Del Pozo, A. (2007). *Aula de la farmacia*. Recuperado el 04 de Mayo de 2013, de Geles en dermofarmacia: conceptos generales y elementos para su formulacion: <http://www.auladelafarmacia.com/resources/files/>

2011/8/22/1313999897544_revAulFarm_migr_AULA_delafarmacia_N36_-
_Medicamentos_y_Servicios_Profesionales_2.pdf

- Kang, B., Seo, J., Lee, G., Kim, J., Kim, S., & Han, Y. e. (2009). Antimicrobial activity of enterocins from *Enterococcus faecalis* SL-5 against *Propionibacterium acnes*, the causative agent in acne vulgaris, and its therapeutic effect. *The Journal of Microbiology*, 47(1), 101-109.
- LeDuc, S. (Abril de 2009). *PR Web*. Recuperado el 26 de Diciembre de 2013, de <http://www.prweb.com/releases/2009/04/prweb2289444.htm>
- Leveau, J. Y., & Carballo, F. J. (2000). *Microbiología Industrial: Los Microorganismos de Interés Industrial*. Acribia.
- López, A., Louzán, T., & Gonzales, S. (2013). *Dianas*. Recuperado el 23 de Enero de 2014, de Evaluación de la seguridad y expediente de información del : <http://www2.uah.es/dianas/2013/02/pdf/dianas.20130904.lopez.pdf>
- Losada, M., Vicario, M., Pujol, Á., Sanz, J., & Nart, J. (2012). Probióticos una opción de futuro. *Revisión*, 22(1), 59-63.
- Malhortra, N. (1997). *Investigacion de mercado*. Mexico: Prentice Hall.
- Mendoza, A. (2009). *Determinacion de la biabilidad de Bifidobacterium bifidum inmovilizado, tratado bajo condiciones gastrointestinales humana simuladas in vitro*. Instituto Politécnico Nacional, Mexico.
- Microbiologics. (2011). *Microbiologics Retail Catalog*, 39, 1-6.
- Microcaya. (2012). *Microcaya*. Recuperado el 20 de Febrero de 2013, de <http://www.microcaya.com/productos.php?tipo=4&sec=1&sub=46&id=416>
- Olmos, L. (2005). *Dermocosmos*. Recuperado el 22 de Noviembre de 2013, de Historia clínica y métodos de exploración no invasivos en dermocosmética: <http://www.dermocosmos.com/espanol/libros/Dermocosmetica%202.htm>
- Orellana, J. (2012). *El blog de la piel sana*. Recuperado el 20 de Nobiembre de 2013, de <http://www.elblogdelapielsana.es/my-cosmetic-product-contains-probiotics-and-prebiotics/>
- Orozco, B. (2013). Vías inflamatorias en la fisiopatología del acné. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 21(4), 339-359.

- Pavicic, T., Wollenwebe, r. U., Farwick, M., & Korting, H. (Junio de 2007). Anti-microbial and -inflammatory activity and efficacy of phytosphingosine: an in vitro and in vivo study addressing acne vulgaris. *International Journal of Cosmetic Science*, 29(3), 181–190.
- Pedrique, M., & Gutiérrez, S. (Febrero de 2002). *Características principales de los agentes etiológicos de las enfermedades estudiadas en los casos de la asignatura microbiología*. Recuperado el 30 de Abril de 2012, de http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/AGENTES_ETIOL%C3%93GICOS_.pdf
- Peña, B. (2013). *Belleza Pura*. Recuperado el 30 de Enero de 2014, de Probióticos, sus beneficios cosméticos con la línea Yogur de Bulgaria: <http://www.bellezapura.com/2013/01/25/probioticos-sus-beneficios-tambien-en-dermatologia/>
- Peral, M., Martinez, M., & Valdez, J. (Febrero de 2009). Topical bacteriotherapy of the skin. *International Wound Journal*, 6(1), 73-81.
- Pérez, S. (2010). *ECO-OIL ARGENTINA S.A.* Recuperado el 04 de Mayo de 2013, de Estudio de eficacia cosmética: <http://www.ecooil.com.ar/wp-content/uploads/2010/07/EVALUACIÓN-COMPARATIVA-DEL-EFECTO-EXFOLIANTE-DE-FORMULACIONES-COSMETICAS.pdf>
- Peyri, J. (1912). Topical bacteriotherapy of the skin. *Cutaneous* , 688-689.
- Prescott, L., Harley, J., & Klein, D. (1999). *Microbiología* (Cuarta ed.). Zaragoza: Mc Graw Hill Interamericana.
- Ramírez, M. d. (2005). *Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca.
- Rigano, L., & Bonfigli, A. (2009). *Portalfarma*. Recuperado el 28 de Abril de 2013, de Cosmética Eficaz y Sensorial: http://www.portalfarma.com/Profesionales/jornadasycongresos/informacion/Documents/PON_2409_Dr_Rigano.pdf
- Rodríguez, J. (2004). *Formulación de una emulsión submicrométrica cosmética para el tratamiento de la celulitis*. Universidad de los Andes, Mérida.

- Rodríguez, M. (2009). *Aislamiento y selección de cepas del género Lactobacillus con capacidad probiótica e inmunomoduladora*. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Rodríguez, V. (2002). *Efecto antagonico y biocontrolador de algunos microorganismos saprofitos contra Rhizoctonia solani un patogeno causante del (damping off) en planta de tomate*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Royal Society of chemistry. (2010). *The Merck Index Online*. Recuperado el 20 de Enero de 2014, de <https://www.rsc.org/merck-index>
- Salazar, L. (2006). *Concepto actual y clasificación de las Dermatitis Profesionales*. (E. N. II, Ed.) Recuperado el 29 de Abril de 2013, de <http://www.ladep.es/ficheros/documentos/Concepto%20actual%20y%20clasificaci%F3n%20de%20las%20dermatosis%20profesionales.pdf>
- Salminen, S., Ouwehand, A., & Isolauri, E. (01 de Mayo de 1998). Clinical applications of probiotic bacteria. (Elsevier, Ed.) *International Dairy Journal*, 8(5), 563-572.
- Samaniego, L., & Sosa, M. (2002). *Bibliociencias*. Recuperado el 03 de Diciembre de 2012, de Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y: <http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH011d/e18c5081.dir/doc.pdf>
- Sánchez, J., & Feris, J. (1998). Antibiógramas: utilidad y limitaciones. *Archivos Dominicanos de Pediatría*, 34(3), 83-87.
- Serna, h. (2012). *Elaboración de jugos de frutas con adición de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico*. Universidad de la Sabana, Chía.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos Fitoterapéuticos*. Bogotá, Colombia: Quebecor.
- Shirai, K., Guerrero, I., & Lara, P. (1996). Bacterias Lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia*, 125-137.
- Sociedad Argentina de Dermatología. (Mayo de 2005). Consenso sobre el Acne. *Consenso sobre el Acne* (págs. 25-26). Buenos Aires: rue Dominó.
- Tannock, G. (1997). Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R y B. *Trends Biotechnology*, 15, 270-274.

- Thermo Scientific. (2001). *Oxoid Microbiology Products*. Obtenido de http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0361&org=82&c=UK&lang=EN
- Ulate, D. (2005). El acné en los adolescentes. *Binasss*, 36-44.
- Vásquez, D. (2008). *Comparación del costo y el beneficio en la fabricación de emulsiones cosméticas de acuerdo al consumo energético*. Tesis de Grado. Universidad de San Carlos de Guatemala: Guatemala
- Vázquez, S., Suarez, H., & Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Chilena de nutrición* , 64-71.
- Zambrano, M. (2010). *Elaboración de un queso fresco con la utilización de un fermento probiótico (Lactobacillus acidophilus)*. Escuela Politécnica Nacional, Quito.

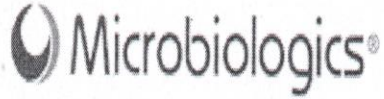
ANEXOS

Anexo 1. Certificado de análisis de la bacteria *P. acnes*

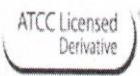



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

| Specifications Microorganism Name: Propionibacterium acnes Catalog Number: 0419 Lot Number: 419-101 Reference Number: ATCC® 11827™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4 | | Expiration Date: 2014/10 Release Information: Quality Control Technologist: Megan Murn Release Date: 2012/12/10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|--|---------|-------------|---|---------------------|---|--------|---|---------------------------|---|-----------------------|---|----------------------------|---|--------------|---|----------------------|---|-------------------------|---|-----------|---|-----------|---|-----------|---|--------------------|---|---------|---|------------------------|---|---|---|--------|---|---|---|----------------------------------|---|---------------------|---|--|---|------------------|---|-------------|---|----------|---|-------------|---|-------------------|---|-------------------|---|--|---|--|---|--------------------|---|-------------|---|-------------|---|------------|---|-------------------|---|---------------------------|---|----------|---|------------|---|------------|---|---------------|---|--|
| Performance | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Macroscopic Features: Punctiform to small, white, opaque, glistening, circular colonies becoming larger and yellowish/tan as they age. | | Medium: A/R SBAP | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Microscopic Features: Small gram positive rods with branching. | | Method: Gram Stain (1) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Vitek ANC (1) <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 80%;">Phenotypic Features</th> <th style="width: 20%;">Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>D-GALACTOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Leucine ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>ELLMAN</td><td>+</td></tr> <tr><td>Phenylalanine ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>L-Proline ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-CELLOBIOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Tyrosine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-GLUCOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MANNOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MALTOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>SACCHAROSE/SUCROSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ARBUTIN</td><td>-</td></tr> <tr><td>N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE</td><td>-</td></tr> <tr><td>5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucoside</td><td>-</td></tr> <tr><td>UREASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucuronide</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-GALACTOPYRANOSIDASE Indoxyl</td><td>+</td></tr> <tr><td>ALPHA-ARABINOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-galactoside</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-MANNOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ARGININE GP</td><td>+</td></tr> <tr><td>PYRUVATE</td><td>+</td></tr> <tr><td>MALTOTRIOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ESCULIN hydrolyse</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-D-FUCOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-N-acetyl-glucosamide</td><td>-</td></tr> <tr><td>5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-mannoside</td><td>+</td></tr> <tr><td>ALPHA-L-FUCOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>PHOSPHATASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-ARABINOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-Ribose 2</td><td>+</td></tr> <tr><td>Phenylphosphonate</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-L-ARABINOFURANOSIDE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-XYLOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>GRAM STAIN</td><td>+</td></tr> <tr><td>MORPHOLOGY</td><td>-</td></tr> <tr><td>AEROTOLERANCE</td><td>-</td></tr> </tbody> </table> | | Phenotypic Features | Results | D-GALACTOSE | - | Leucine ARYLAMIDASE | + | ELLMAN | + | Phenylalanine ARYLAMIDASE | + | L-Proline ARYLAMIDASE | + | L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE | - | D-CELLOBIOSE | - | Tyrosine ARYLAMIDASE | - | Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE | - | D-GLUCOSE | + | D-MANNOSE | + | D-MALTOSE | - | SACCHAROSE/SUCROSE | - | ARBUTIN | - | N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE | - | 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucoside | - | UREASE | - | 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucuronide | - | BETA-GALACTOPYRANOSIDASE Indoxyl | + | ALPHA-ARABINOSIDASE | - | 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-galactoside | - | BETA-MANNOSIDASE | - | ARGININE GP | + | PYRUVATE | + | MALTOTRIOSE | - | ESCULIN hydrolyse | - | BETA-D-FUCOSIDASE | - | 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-N-acetyl-glucosamide | - | 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-mannoside | + | ALPHA-L-FUCOSIDASE | - | PHOSPHATASE | - | L-ARABINOSE | - | D-Ribose 2 | + | Phenylphosphonate | - | ALPHA-L-ARABINOFURANOSIDE | - | D-XYLOSE | - | GRAM STAIN | + | MORPHOLOGY | - | AEROTOLERANCE | - | Other Features/ Challenges: Results <div style="text-align: center;">   Brad Goskovicz, President AUTHORIZED SIGNATURE </div> |
| Phenotypic Features | Results | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-GALACTOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leucine ARYLAMIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ELLMAN | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Phenylalanine ARYLAMIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-Proline ARYLAMIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-CELLOBIOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tyrosine ARYLAMIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-GLUCOSE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-MANNOSE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-MALTOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SACCHAROSE/SUCROSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ARBUTIN | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucoside | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| UREASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucuronide | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BETA-GALACTOPYRANOSIDASE Indoxyl | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ALPHA-ARABINOSIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-galactoside | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BETA-MANNOSIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ARGININE GP | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PYRUVATE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MALTOTRIOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ESCULIN hydrolyse | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BETA-D-FUCOSIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-N-acetyl-glucosamide | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-mannoside | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ALPHA-L-FUCOSIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PHOSPHATASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-ARABINOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-Ribose 2 | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Phenylphosphonate | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ALPHA-L-ARABINOFURANOSIDE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-XYLOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GRAM STAIN | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MORPHOLOGY | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AEROTOLERANCE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

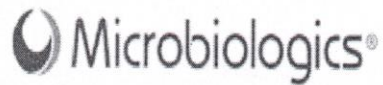
| | |
|---|--|
| Specifications Microorganism Name: Propionibacterium acnes Catalog Number: 0419 Lot Number: 419-101 Reference Number: ATCC® 11827™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4 | Expiration Date: 2014/10 Release Information: Quality Control Technologist: Megan Murn Release Date: 2012/12/10 |
| <p>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <p> (*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p> (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> <p>TESTING CERT #2655.01</p> | |

Anexo 2. Certificado de análisis de la bacteria *L. acidophilus*





Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

| Specifications Microorganism Name: Lactobacillus acidophilus Catalog Number: 0243 Lot Number: 243-30 Reference Number: ATCC® 4356™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: N/A (Pellet is grown in MRS broth) Passage from Reference: 4 | | Expiration Date: 2015/03 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2013/5/24 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------------------|---|---------|-------------------------|---|-------------|---|-------------------------|---|---------------------------|---|-------------|---|----------|---|--------------------|---|----------------------------|---|------------------------|---|----------------------|---|-----------|---|------------------|---|-----------|---|------------|---|-----------------|---|---------------------------------|---|-----------------------|---|--------|---|-------------------|---|--------------|---|--------|---|--------------------|---|-------------|---|------------------|---|---|---|------------------------|---|-------------------|---|------------|---|---------------------|---|---------------------|---|----------|---|----------|---|-------------|---|-------------|---|-------------------|---|-------------------|---|------------|---|--------------------|---|-------------------|---|--------|---|----------|---|
| Performance | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Macroscopic Features: Two colony types are present. The predominant colonies are medium to large, circular to slightly irregular, low convex, erose edge and rough; the other type is small, circular, convex, entire edge and smooth. Colonies are translucent and weakly alpha hemolytic. | | Medium: CNA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Microscopic Features: Gram positive rods with rounded ends, occurring singly, in pairs, and in short chains. | | Method: Gram Stain (1) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Vitek CBC (1) | | Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th>Phenotypic Features</th> <th>Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-GALACTOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ORNITHINE DECARBOXYLASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Phenylalanine ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>ARGININE GP</td><td>-</td></tr> <tr><td>PYRUVATE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-GALACTOSIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>SUCCINATE alkalisation</td><td>-</td></tr> <tr><td>Tyrosine ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-GLUCOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-GLUCOSIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MALTOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-MANNITOL</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-XYLOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)</td><td>+</td></tr> <tr><td>L-Proline ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>LIPASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-MANNOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-MELEZITOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>UREASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>SACCHAROSE/SUCROSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-TREHALOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>CITRATE (SODIUM)</td><td>-</td></tr> <tr><td>5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucuronide</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-LACTATE alkalisation</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GLUCOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-SORBITOL</td><td>+</td></tr> <tr><td>ALPHA-GALACTOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Glycine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-MALATE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-RIBOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>MALTOTRIOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-GLUTAMINE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Phenylphosphonate</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-D-FUCOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>COURMARATE</td><td>+</td></tr> <tr><td>2-Keto-D-Gluconate</td><td>-</td></tr> <tr><td>ESCULIN hydrolyse</td><td>-</td></tr> <tr><td>ELLMAN</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-XYLOSE</td><td>-</td></tr> </tbody> </table> | Phenotypic Features | | Results | Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE | + | D-GALACTOSE | - | ORNITHINE DECARBOXYLASE | - | Phenylalanine ARYLAMIDASE | + | ARGININE GP | - | PYRUVATE | - | BETA-GALACTOSIDASE | + | L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE | - | SUCCINATE alkalisation | - | Tyrosine ARYLAMIDASE | + | D-GLUCOSE | + | BETA-GLUCOSIDASE | + | D-MALTOSE | - | D-MANNITOL | - | BETA-XYLOSIDASE | - | O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.) | + | L-Proline ARYLAMIDASE | - | LIPASE | - | ALPHA-MANNOSIDASE | - | D-MELEZITOSE | - | UREASE | - | SACCHAROSE/SUCROSE | + | D-TREHALOSE | + | CITRATE (SODIUM) | - | 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucuronide | - | L-LACTATE alkalisation | - | ALPHA-GLUCOSIDASE | - | D-SORBITOL | + | ALPHA-GALACTOSIDASE | - | Glycine ARYLAMIDASE | - | D-MALATE | - | D-RIBOSE | - | MALTOTRIOSE | - | L-GLUTAMINE | - | Phenylphosphonate | + | BETA-D-FUCOSIDASE | - | COURMARATE | + | 2-Keto-D-Gluconate | - | ESCULIN hydrolyse | - | ELLMAN | - | D-XYLOSE | - |
| Phenotypic Features | Results | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-GALACTOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ORNITHINE DECARBOXYLASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Phenylalanine ARYLAMIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ARGININE GP | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PYRUVATE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BETA-GALACTOSIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SUCCINATE alkalisation | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tyrosine ARYLAMIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-GLUCOSE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BETA-GLUCOSIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-MALTOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-MANNITOL | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BETA-XYLOSIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.) | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-Proline ARYLAMIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| LIPASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ALPHA-MANNOSIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-MELEZITOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| UREASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SACCHAROSE/SUCROSE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-TREHALOSE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CITRATE (SODIUM) | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucuronide | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-LACTATE alkalisation | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ALPHA-GLUCOSIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-SORBITOL | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ALPHA-GALACTOSIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Glycine ARYLAMIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-MALATE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-RIBOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MALTOTRIOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-GLUTAMINE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Phenylphosphonate | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BETA-D-FUCOSIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| COURMARATE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2-Keto-D-Gluconate | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ESCULIN hydrolyse | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ELLMAN | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-XYLOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

| | |
|--|---|
| Specifications Microorganism Name: Lactobacillus acidophilus Catalog Number: 0243 Lot Number: 243-30 Reference Number: ATCC® 4356™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: N/A (Pellet is grown in MRS broth) Passage from Reference: 4 | Expiration Date: 2015/03 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2013/5/24 |
| <p>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <p> (*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p> (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> <p>TESTING CERT #2655.01</p> | |

Anexo 3. Fotografías de la activación de las cepas bacterianas

Activación de *L. acidophilus*



Activación en caldo

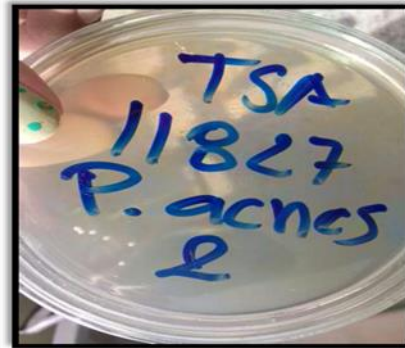


Activación en placa

Activación *P. acnes*

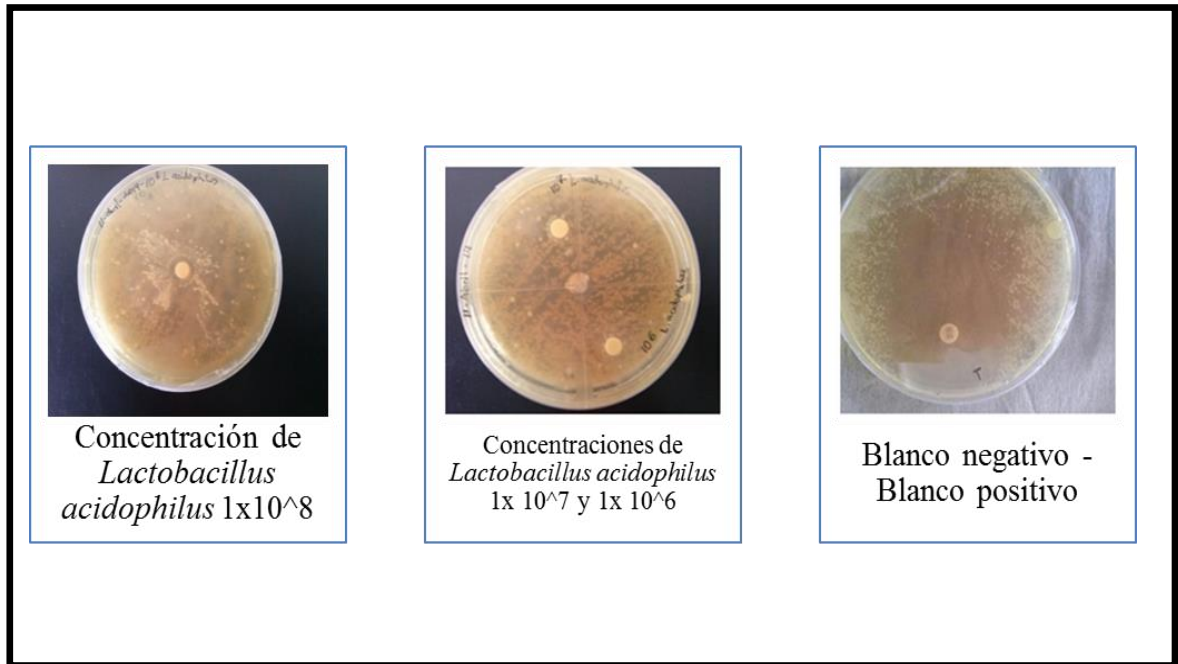


Activación en caldo

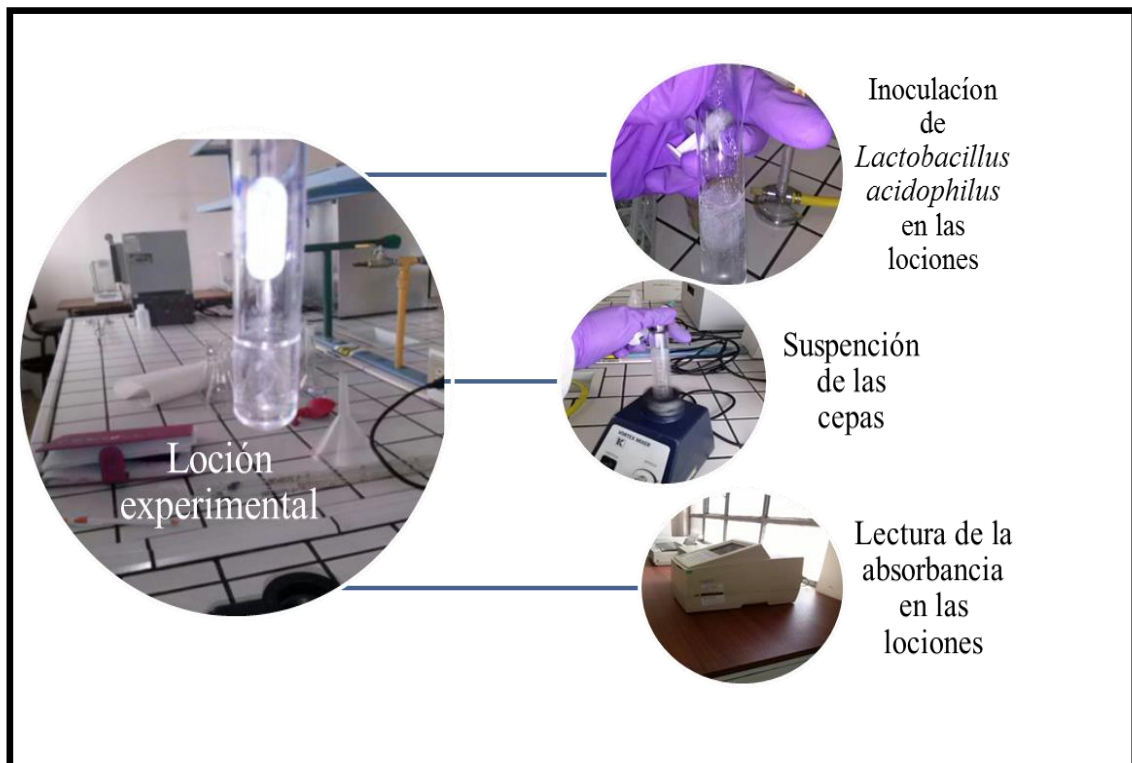


Activación en placa

Anexo 4. Fotografías de la prueba de antagonismo de *L. acidophilus*



Anexo 5. Fotografías de la adición de *L. acidophilus* en las lociones



Anexo 6. Prueba de antagonismo de las cuatro lociones



Loción A



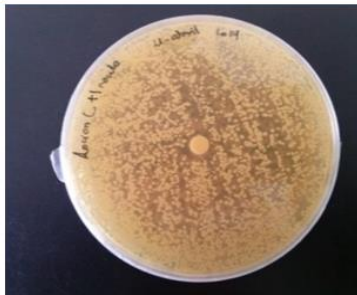
Blanco negativo -
Blanco positivo



Loción B



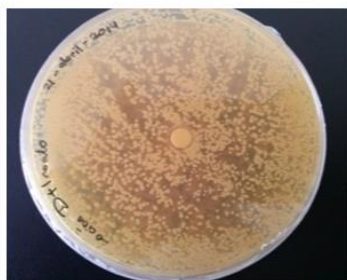
Blanco negativo -
Blanco positivo



Loción C



Blanco negativo - Blanco
positivo



Loción D



Blanco negativo -
Blanco positivo

Anexo 7. Fotografías del test de irritabilidad



Firma de carta consentimiento



Aplicación del parche



Revisión del parche



Evaluación de resultados

Anexo 8. Fotografías de la actividad cosmética *in vivo*



Evaluación dermatológica



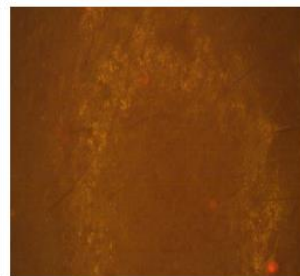
Material de limpieza entregado



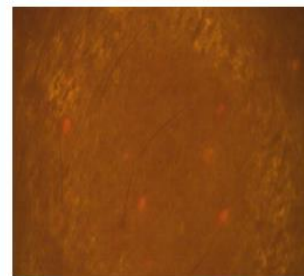
Lavado de la zona a ensayar



Visualización de porfirinas con el equipo Visiopor PP34N®



Porfirinas antes de la aplicación de la loción en el adolescente **Paul Vicente 21-05-2014**



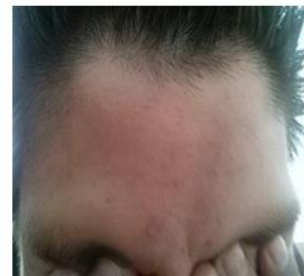
Porfirinas despues de la primera aplicación en el adolescente **Paul Vicente 22-05-2014**



Porfirinas al final del estudio en el adolescente **Paul Vicente 23-04-2014**



Lesiones de acné al inicio de estudio en el adolescente **Paul Vicente**



Lesiones de acné al final del estudio en el adolescente **Paul Vicente**

Anexo 9. Encuesta de selección de participantes para el test de irritabilidad

Cuestionario para las personas voluntarias previo a la evaluación

NOMBRE:

EDAD:

Preguntas

1. ¿Con qué frecuencia ha acudido al médico en este último año?

- Cada mes Cada 3 meses Cada 6 meses
 Una vez al año

SÍ NO

2. ¿Está en estado de gestación o dando de lactar?

3. ¿Hace uso de un medicamento tópico o sistémico (vía oral o inyectable)?

¿Cuál?

5. ¿Es alérgico a algún medicamento o producto tópico?

¿Cuál?

6. ¿Tiene alguna enfermedad dermatológica como psoriasis, eczema u otro tipo de erupciones?

¿Cuál?

7. Marque el tipo de piel que corresponda a la suya

- I. Piel blanca pálida II. Piel blanca
 III. Piel trigueña clara IV. Piel trigueña

8. ¿Se encuentra su piel intacta en la parte lateral del brazo izquierdo entre el hombro y el codo?

9. ¿Tiene alguna marca o posibles reacciones cutáneas en la zona indicada en la pregunta anterior como: desordenes de pigmentación, malformaciones vasculares, escaras, pilosidad aumentada, quemaduras solares, etc.?

11. ¿Ha sido sometido a algún trasplante de órgano?

12. ¿Tiene auto-reconocimiento de piel sensible?

13. ¿Ha usado esteroides tópicos o sistémicos y/o antihistamínicos por al menos 7 días antes del inicio del estudio o se está aplicando cualquier medicamento en el sitio de aplicación del parche?

14. ¿Presenta asma severa o algún tipo de alergia respiratoria?

15. ¿Padece de diabetes y está tomando insulina?

16. ¿Tiene planes de exposición intensa a la luz solar o a sesiones de bronceado durante la semana del 5 al 9 de mayo?

17. ¿Tiene planes de baño en el mar, ir a la piscina o al sauna durante la semana del 5 al 9 de mayo?

Espacio reservado para el investigador

¿El voluntario es aceptado para la evaluación?

SÍ

NO

Firma del investigador

Fecha:

Anexo 10. Carta de consentimiento de los voluntarios para el test de irritabilidad

Consentimiento informativo de participación en un proyecto de investigación

✓ **Título del proyecto**

Test de irritabilidad - método patch test simple único.

✓ **Equipo de investigadores**

Yo, Victoria Sheila Pumisacho Ocaña, investigadora egresadas de la Facultad de Ingeniería en Biotecnología, asesorada por la Ing. Tatiana de los Ángeles Mosquera Tayupanta, Directora del CIVABI, solicitamos a usted su colaboración para la realización de éste trabajo de investigación. Le pedimos entender todos los pasos en detalle y, si está de acuerdo, firmar el consentimiento informado

✓ **Introducción / propósito**

En el presente estudio pretendemos establecer la capacidad de una loción para causar irritación alérgica y/o sensibilización, siendo esto de gran importancia para que los fabricantes puedan asegurar que sus productos sean "no irritantes" para el usuario y prevenir daños a la salud.

Los propósitos del estudio de investigación son:

- Determinar mediante el contacto epidérmico único la capacidad potencial del producto en estudio para inducir irritación primaria o sensibilización alérgica por contacto.
- Evaluar el riesgo de irritación primaria o sensibilización alérgica por contacto de una loción que contiene una concentración establecida de *Lactobacillus*

acidophilus después de una aplicación única, sobre la superficie externa del brazo bajo patch test.

- Demostrar la inocuidad dérmica de la loción.

✓ **Participación**

Su participación es completamente voluntaria y puede retirarse en el momento que usted lo decida. Su participación en el estudio se inicia con el llenado de una encuesta, la cual será evaluada y se verificará que cumpla los criterios de inclusión para participar en el estudio.

Usted puede retirarse de la investigación en cualquier momento, si lo desea o así lo requiere, a discreción del investigador y sin que el cese de su participación esté sujeta a castigo alguno o recorte de sus derechos.

✓ **Procedimiento**

El estudio inicia con el llenado de la encuesta, para verificar si es un voluntario apto para el estudio, dichas personas deberán firmar una carta de consentimiento para participar voluntariamente en la prueba. Previo a la aplicación de los parches la piel será limpiada con alcohol. Luego se aplica un parche en el cual se colocará la loción con una concentración establecida de *Lactobacillus acidophilus* en una dosis de 0,02 ml aproximadamente en la superficie externa del brazo, además se aplicará un parche solo (sin producto) como testigo negativo. Finalmente se debe esperar 48 horas para retirar los parches y se espera 30 minutos para realizar el examen macroscópico y registrar los resultados.

✓ **Riesgos / incomodidades**

El voluntario deberá informar cualquier molestia o incomodidad que pueda surgir durante la evaluación del producto, el encargado del estudio evaluará al voluntario.

No debe mojar el parche durante el período de aplicación. Si usted cambia alguno de sus hábitos, le pedimos que nos mantenga informados, de manera que podamos interpretar mejor los resultados.

No haga uso de algunos productos (desodorantes o antitranspirantes, talco en polvo, aceite de baño, cremas, lociones, perfumes, colonias y medicación tópica) en áreas cercanas a los sitios de estudio. Si usted usa alguno de estos productos o si toma medicación sistémica, por favor, háganoslo saber.

Todas las materias primas utilizadas en el producto están aprobadas para uso tópico y no son tóxicas. Sin embargo, de igual manera que con otros productos, pueden causar inesperadas reacciones como “enrojecimiento”, “hinchazón”, “picor” y “escozor” en los sitios de aplicación del producto; en caso de intenso escozor u otros signos fuertes de irritación, por favor, infórmenos inmediatamente, contactándonos vía telefónica al 0998371747.

✓ **Problemas o preguntas**

Si usted tuviese preguntas adicionales durante el desarrollo de este estudio, acerca de la investigación o sus derechos como participante en la investigación, puede dirigirse a:

Ing. Tatiana Mosquera T.

Directora CIVABI.

Universidad Politécnica Salesiana

Tel.: (593-2)39628979

Celular: 095400925

✓ **Consentimiento / participación voluntaria**

Su participación es completamente voluntaria, puede consultar con otras personas (familiares, médico o aquella que usted crea conveniente para poder participar en este estudio) y puede retirarse en el momento que usted lo decida.

Una copia de este documento se mantendrá en posesión de los investigadores responsables, y otra será entregada al sujeto voluntario.

HE LEIDO Y COMPRENDIDO EL PRESENTE DOCUMENTO. HE QUEDADO SATISFECHO/A Y MIS PREGUNTAS HAN SIDO RESPONDIDAS. YO, VOLUNTARIAMENTE Y SIN PRESIÓN ALGUNA, ACEPTO MI PARTICIPACIÓN EN EL PRESENTE ESTUDIO.

Quito, de de 2014

.....
Firma del Participante
Apellidos y Nombres del Participante

.....
Firma del Investigador Responsable
Ing. Tatiana de los Ángeles Mosquera Tayupanta
Directora del CIVABI

.....
Firma del Investigador Responsable
Victoria Sheila Pumisacho Ocaña

Anexo 11. Ficha de información básica de los voluntarios a participar en el test de irritabilidad

Ficha No.

FICHA PERSONAL DEL VOLUNTARIO

Nombre

Apellido Paterno Apellido Materno Nombres

Fecha de Nacimiento: Lugar: Edad:

Día/Mes/Año

Sexo Estado Civil: No. Cargas familiares:

Masculino Femenino

E-mail:

Telf. casa: Celular

Dirección Domicilio:

Anexo 12. Historia clínica de los voluntarios para el test de actividad cosmética

Ficha No.

FICHA PERSONAL DEL VOLUNTARIO

Nombre
Apellido Paterno Apellido Materno Nombres

Fecha de Nacimiento Lugar de nacimiento Edad
Día/Mes/Año

Ocupación

Sexo Estado Civil No. Cargas familiares
Masculino Femenino

Nivel de Instrucción
Primaria Secundaria Superior Ninguna

Nivel económico
Alto Medio Bajo

E-mail

Telf. Casa Celular

Barrio

Dirección

Domicilio

Referencia

ANTECEDENTES CLÍNICOS

Antecedentes personales:

.....
.....
.....
.....
.....
.....

SÍ **NO**

¿Ha usado o está usando anticonceptivos?

| | |
|--|--|
| | |
| | |

¿Ha utilizado tratamientos para el acné con anterioridad?

¿Cuál?.....

¿Presenta alergia a algún fármaco?

| | |
|--|--|
| | |
|--|--|

¿Cuál?.....

Anexo 13. Carta de consentimiento de los voluntarios para el test de actividad cosmética

Consentimiento informativo de participación

✓ Título del proyecto

Estudio de eficacia cosmética instrumental de una loción probiótica.

✓ Equipo de investigadores

Yo, la investigadora Victoria Pumisacho, asesoradas por la Ing. Tatiana Mosquera, Directora del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI), solicitamos a usted la colaboración de su representado para la realización de este estudio. Le pedimos entender todos los pasos en detalle y, si está de acuerdo, firmar el consentimiento informado.

✓ Introducción / propósito

En la presente investigación pretendemos realizar un estudio de eficacia cosmética *in vivo* de un producto, mediante un método no invasivo, utilizando un equipo de bioingeniería (Visiopor PP34N®), en voluntarios con acné grado II.

✓ Participación

La participación de su representado es completamente voluntaria y puede retirarlo en el momento que usted lo decida. El estudio inicia con el llenado de una ficha informativa después de haber sido diagnosticado con acné grado II.

✓ Procedimiento

El estudio tiene una duración de 2 días, el cual consiste en una primera evaluación antes del uso del producto y 1 evaluación posterior a las 24 horas y 2 días después de la

primera aplicación. Para ello se procederá a un lavado con 25 ml de un jabón neutro, y colocar 5 gotas en cada una de las lesiones de acné en la zona de estudio. Para evaluar la eficacia cosmética de la loción probiótica se utilizará el equipo Visiopor PP34N®, cámara que permite captar imágenes de la superficie de la piel utilizando luz ultravioleta y de esta manera medir cuantitativamente las porfirinas generadas por *P. acnes*, principal bacteria causante del acné.

✓ **Riesgos / incomodidades**

El voluntario deberá informar cualquier molestia o incomodidad que pueda surgir durante la aplicación del producto.

No haga uso de otros productos antibacterianos orales y/o tópicos durante el estudio. Si usted usa alguno de estos productos o si toma medicación sistémica, por favor, háganoslo saber.

Todas las materias primas utilizadas en el producto están aprobadas para uso tópico y no son tóxicas ni irritantes. Sin embargo, de igual manera que con otros productos, pueden causar inesperadas reacciones como “enrojecimiento” y “picor” en los sitios de aplicación del producto; en caso de irritación u otros signos, por favor, infórmenos inmediatamente, contactándonos vía telefónica al teléfono 0998371747 .

✓ **Problemas o preguntas**

Si usted tuviese preguntas adicionales durante el desarrollo de este estudio, acerca de la investigación, puede dirigirse a:

Victoria Pumisacho

Tel.: 2886161

Celular: 0998371747

✓ **Consentimiento / participación voluntaria**

Su participación es completamente voluntaria, puede consultar con otras personas (familiares, médico o aquella que usted crea conveniente para poder participar en este

estudio) y puede retirar a su representado en el momento que usted lo decida informando previamente a los investigadores.

Una copia de este documento se mantendrá en posesión de los investigadores responsables, y otra será entregada a usted.

HE LEIDO Y COMPRENDIDO EL PRESENTE DOCUMENTO. HE QUEDADO SATISFECHO/A Y MIS PREGUNTAS HAN SIDO RESPONDIDAS.

YO, VOLUNTARIAMENTE Y SIN PRESIÓN ALGUNA, ACEPTO QUE MI REPRESENTADO PARTICIPACIPE EN EL PRESENTE ESTUDIO.

Quito, 20 de mayo del 2013

.....

Firma del Representante

Apellidos y Nombres del Participante

.....

Firma del Investigador Responsable

Victoria Pumisacho

Anexo 14. Certificado de evaluación dermatológica

Quito, 20 de mayo de 2014

CERTIFICADO DE EVALUACIÓN DERMATOLÓGICA

Yo, Dra. Marcela Paredes certifico que he realizado el diagnóstico visual del tipo de acné de los adolescentes participantes en el estudio de evaluación *in vivo* del antagonismo de *Lactobacillus acidophilus* frente a *Propionibacterium acnes* realizado por la investigadora Victoria Pumisacho dirigida por la Ing. Tatiana Mosquera.



Dra. Marcela Paredes

C.I. 1803569613

Dra. Marcela Paredes
DERMATOLOGÍA
MSP: L:26 F:02 N°:04

Dra. Marcela Paredes
DERMATOLOGÍA
MSP: L:26 F:02 N°:04