



11
204

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES
ZARAGOZA

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS EN EL DESARROLLO DE UN PRODUCTO COSMÉTICO

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MARIA OLIVIA FLORES FIGUEROA

MEXICO D. F.

1991

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

CAPITULO I

INTRODUCCION.....	1
-------------------	---

CAPITULO II

ANTECEDENTES.....	3
-------------------	---

A. DESARROLLO DE UN PRODUCTO COSMETICO.....	3
---	---

1. ¿Qué es desarrollo de un producto cosmético?.	3
--	---

2. ¿Quiénes intervienen?.....	3
-------------------------------	---

B. LOCIONES FACIALES.....	6
---------------------------	---

1. Definición de loción facial.....	6
-------------------------------------	---

2. Fundamentos de formulación.....	8
------------------------------------	---

3. Pasos a seguir en el desarrollo de la formula ción.....	17
---	----

4. Propuesta de fórmula.....	19
------------------------------	----

5. Ingredientes activos.....	20
------------------------------	----

6. Especificaciones.....	24
--------------------------	----

7. Método de manufactura.....	25
-------------------------------	----

C. ASPECTOS MICROBIOLOGICOS EN EL DESARROLLO DE UN COSMETICO.....	26
--	----

1. Responsabilidades de un laboratorio de micro- biología.....	26
---	----

2. Origen y tipos de contaminación microbiana...28	
--	--

3. Componentes de las formulaciones y su influencia microbiológica.....	30
4. Selección de los conservadores.....	34
5. Frecuencia de uso de conservadores en fórmulas cosméticas según la FDA-1990.....	35
6. Factores que influyen en la eficacia de un conservador.....	36
7. Características de los conservadores.....	39
D. PRUEBA DE RETO MICROBIOLÓGICO.....	44
1. Pautas de límites microbiológicos.....	46
2. Características de los microorganismos indicadores.....	48
3. Criterio de aceptación/rechazo de la prueba de reto.....	51

CAPITULO III

OBJETIVOS, PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPOTESIS

A. OBJETIVOS.....	52
B. PLANTEAMIENTOS DEL PROBLEMA.....	52
C. HIPOTESIS.....	54

CAPITULO IV

MATERIAL Y METODOS.....	55
A. MATERIAL.....	55
B. EQUIPO.....	56
C. SUSTANCIAS Y REACTIVOS.....	57
D. METODOS.....	60
1. Procedimiento de prueba de reto microbiológico.....	60
2. Procedimiento de inoculación.....	62
3. Preparación, mantenimiento y estandarización del microorganismo.....	63
4. Mantenimiento y preparación del microorganismo fúngico.....	68
5. Cuenta total en placa de microorganismos aerobicos para formulaciones miscibles o dispersables en agua sometidas a la prueba de reto.....	71

CAPITULO V

RESULTADOS.....74

- A. DETERMINACION DE ABSORBANCIAS PARA CONTROLAR LA
CONCENTRACION DE LOS MICROORGANISMOS BACTERIALES..74
 - 1. Microorganismo: *Escherichia coli*.....74
 - 2. Microorganismo: *Staphylococcus aureus*.....75
 - 3. Microorganismo: *Pseudomona aeruginosa*.....76
- B. CONTROL DE LA CONCENTRACION PARA EL MICROORGANISMO
FUNGICO.....77
 - 1. Microorganismo: *Aspergillus niger*.....77
- C. DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE CORRELACION DE LAS
CURVAS ESTANDAR PARA EL CONTROL DE LA CONCENTRACION
DE LOS MICROORGANISMOS.....79
 - 1. Coeficiente de correlación (r) de 3 curvas
estandar de *Escherichia coli* a una absorbancia
de 0.03 a 420 nm.....81
 - 2. Coeficiente de correlación (r) de 3 curvas
estandar de *Staphylococcus aureus* a una absor-
bancia de 0.03 a 420 nm.....82
 - 3. Coeficiente de correlación (r) de 3 curvas
estandar de *Pseudomona aeruginosa* a una
absorbancia de 0.02 a 420 nm.....83

D. CURVAS ESTANDAR DE LA PRUEBA DE RETO MICROBIOLOGICO PARA LA LOCION FACIAL.....	85
E. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE RETO DE LA LOCION FACIAL REGENERATIVA.....	87

CAPITULO VI

ANALISIS DE RESULTADOS.....	90
-----------------------------	----

CAPITULO VII

CONCLUSIONES.....	95
-------------------	----

CAPITULO VIII

RECOMENDACIONES.....	97
----------------------	----

CAPITULO IX

BIBLIOGRAFIA.....	98
-------------------	----

I. INTRODUCCION

En la presente tesis se implementa la prueba titulada "Prueba de reto microbiológico", como parte integral en el desarrollo de un cosmético. Además, se da a conocer la investigación que hay detrás de un desarrollo de un cosmético, quiénes intervienen en el desarrollo y se ha desarrollado una loción facial regenerativa a la cual se le ha realizado el estudio de reto microbiológico con el fin de establecer su sistema preservativo eficaz.

Las lociones faciales regenerativas, tienen la función de mantener y activar el funcionamiento de las células de la piel y por lo tanto retardar el envejecimiento; para tal efecto éstas son formuladas con ingredientes activos, siendo estos, así como la elevada cantidad de agua de las lociones faciales, excelentes sustratos para el crecimiento microbiano (bacterias, levaduras y hongos saprófitos).

Por lo anterior es importante que un producto cosmético, contenga sustancias conservadoras que inhiban el crecimiento de los microorganismos provenientes del agua, los equipos, el medio ambiente, las materias primas y los que pudieran llegar al producto durante su uso y abuso por parte del consumidor.

Los productos, al llegar al usuario, deben encontrarse sin contaminación microbiana, sin embargo, la experiencia demuestra que esto no sucede y uno de los motivos principales al encontrar un producto contaminado, es el inadecuado sistema conservador en el producto por lo que la prueba de reto microbiológico es de gran importancia para asegurar que la fórmula brinde al usuario un producto de calidad.

La prueba de reto microbiológico entonces, sirve para determinar los tipos y concentraciones óptimas de los conservadores para tener un sistema conservador eficaz que impida la contaminación microbiana, desde la fabricación del producto hasta que sea usado por el consumidor. También la prueba de reto microbiológico se utiliza para modificar un producto existente con problemas de contaminación.

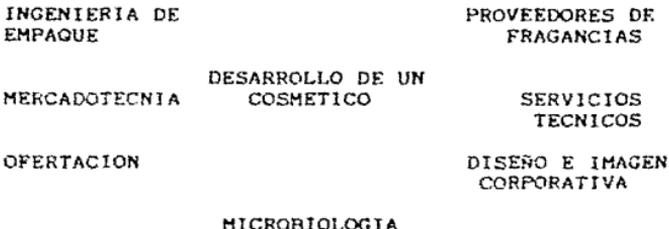
II. ANTECEDENTES

A. DESARROLLO DE UN PRODUCTO COSMETICO

1. ¿Qué es el desarrollo de un producto cosmético?

Es el conjunto de actividades de profesionales altamente capacitados, su función es el crear nuevos productos, de acuerdo a los pedidos del mercado para llenar las necesidades y expectativas de nuestros clientes.

2. ¿Quiénes intervienen? Intervienen diferentes áreas y cada una de ellas es muy importante como parte integral en el desarrollo. En el siguiente esquema se representan las áreas involucradas:



- a. Mercadotecnia. Es el área que se encarga de definir el concepto del producto, es decir, qué función va a transmitir y qué características fisicoquímicas va a tener; además del nombre, el empaque, tipografía del producto y las características del perfume.

Es función del área de mercadotecnia realizar estudios de las necesidades del mercado, recopilar datos de dichos estudios y de esta manera definir el concepto del producto.

- b. Servicios técnicos. En base a la definición de parte de mercadotecnia de la función y características fisicoquímicas del producto; esta área desarrolla la fórmula, realiza las pruebas de estabilidad, realiza las especificaciones y método de manufactura del producto.

- c. Ingeniería de empaque. En base a la definición por parte de mercadotecnia del empaque, el área de productos nuevos se encarga de el diseño del empaque, define sus especificaciones y contacta los proveedores

que le den el servicio de producir cada uno de los materiales del producto.

- d. Proveedores de fragancias. El área de mercadotecnia define cuál característica va a reafirmar el perfume en un producto cosmético; y los proveedores de fragancias van a desarrollar y presentar muestras de perfumes para la elección final.
- e. Ofertación. Es el área que determina la campaña o fecha de lanzamiento del producto.
- f. Diseño e imagen corporativa. Se encarga de la campaña publicitaria que se le va a dar al producto.
- g. Microbiología. Su función es la realización de la prueba de reto microbiológico paralelamente al desarrollo de la fórmula para concetir un producto microbiológicamente seguro y estable.

B. LOCIONES FACIALES

1. Definición de loción facial. Las lociones faciales son emulsiones o preparados semisólidos que pueden presentar diferentes grados de viscosidad a temperatura ambiente y están destinados a ser aplicados sobre la piel y esparcirse con facilidad sobre ésta.
La función cosmética de una loción facial es limpiar, proteger, perfumar, enmascarar o disimular la apariencia de la piel y en algunos especialmente el retardar la evolución natural del envejecimiento. Las lociones pueden clasificarse de dos maneras:

De acuerdo a su finalidad. Limpiadoras, emolientes, hidratantes, astringentes, regenerativas, y de usos múltiples.

De acuerdo al sitio de aplicación. Para los ojos, para el cuello, faciales y para manos y cuerpo.

Cabe aclarar que también se conoce como loción a una solución acuosa o hidroalcohólica, pero en este informe no será considerado.

La manufactura de las lociones suele ser compleja, debido a que la emulsión puede romperse con facilidad ocasionando una separación de fases, pero éstas pueden ofrecer ventajas como son: facilidad de aplicación, una buena penetración de la piel, fáciles de eliminar con agua, dejan una sensación liviana sobre la piel, su formulación puede ser económica, el proceso de envasado es simple y la limpieza de los equipos es fácil.(2)

También puede ofrecer desventajas al tener un alto contenido de agua, lo cual favorece el desarrollo microbiano.(8)

2. Fundamentos de formulación e ingredientes básicos

- a. Fundamentos de formulación. La loción facial es una emulsión la cual se define como un sistema disperso que contiene dos fases líquidas, una de la cual se encuentra en forma de glóbulos (fase interna) dentro de la otra fase (fase externa); estas dos fases líquidas son inmiscibles entre sí.(2)

En el caso de las lociones, la fase externa es el agua y la fase interna es el aceite. Los factores que pueden afectar la estabilidad de las emulsiones son:

- 1) Velocidad de sedimentación. Para explicar la influencia de este factor, se recurrirá a la ley de Stokes, que estudia la velocidad de sedimentación de una partícula esférica en el seno de un líquido y puede expresarse así:

$$v = \frac{2}{9} \frac{(d - d_0)^2 r^2 g}{\eta}$$

Donde "d" corresponde a la densidad de la fase dispersa, "do" a la densidad de la emulsión, "r" al radio de la partícula esférica, "n" a la viscosidad de la emulsión "g" a la constante gravitatoria y "V" a la velocidad de sedimentación de una esfera en un líquido viscoso.(2)

En esta ecuación se observa que un aumento de la viscosidad de la fase externa trae como consecuencia una disminución en la velocidad de separación, además, si la densidad de la fase interna es menor que la de la fase externa, el término $(d - d_o)$ de la ecuación, será negativo y la fase interna flotará. Este criterio es aplicable a la emulsión aceite en agua en el caso de las lociones.

- 2) **Temperatura.** La estabilidad de las emulsiones es afectada por la temperatura, en general, a medida que aumenta la temperatura, disminuye la viscosidad y según la ley de Stokes, la velocidad de sedimentación aumenta. (2)

- 3) **Oxidación.** En la emulsión (aceite/agua) la fase interna puede estar formada por aceites de origen animal o vegetal, y en ellos están presentes dobles enlaces de las cadenas de los ácidos grasos más frecuentes (palmítico, oleico y esteárico), los cuales pueden inducir a la fijación de átomos de oxígeno, fenómeno conocido como oxidación; el cual nos da como resultado la rancidez de la emulsión. (2)

- 4) **Contaminación microbiológica.** Es importante considerar ésta, ya que además de alterar la estabilidad de la emulsión, afecta tanto la calidad como la apariencia del producto, debido al

cambio del PH del medio, medio, produciéndose como consecuencia, fenómenos eléctricos (alteración del potencial electrocinético o Z). (2)

Por otra parte conocemos que algunos microorganismos pueden utilizar sustancias del producto para su metabolismo, alterando la composición química del producto, el olor y el color.

- 5) Sistema emulsificante. Para la elección del sistema emulsificante hay que considerar qué tipo de emulsión se desea obtener; aceite en agua (o/w), agua en aceite (w/o) o mixtas. Dependiendo de la acción o finalidad que se le quiera dar al producto se escogerá el tipo de emulsión a usar y en base a esto, se elegirán los agentes espesantes, emolientes, hidratantes, y demás ingredientes.

Conociendo cuáles son estas materias primas, se procederá a determinar el HLB (Balance lipófilo-hidrófilo) que requiere la emulsión para continuar con la elección de el o los agentes tensoactivos que necesita la emulsión. Cuando en el emulsificante predomina el grupo que tiene afinidad por aceites, el HLB es bajo (4-6) para producir emulsiones de agua en aceite. Cuando predomina el grupo afin al agua, el emulsificante tiene un HLB alto (8-18) y es usado para emulsiones de aceite en agua. (17)

Debe tenerse siempre en mente que los sistemas de emulsiones más estables, usualmente consisten en mezclas de dos o más emulsificantes; una porción teniendo lipófilos, la otra hidrófilos. (17)

- b. Ingredientes básicos. En cosméticos, las emulsiones son usadas como portadores de

emolientes y humectantes, agentes activos y pigmentos. Sin embargo, se necesitan otros ingredientes para acentuar estas propiedades benéficas. Los constituyentes comunes de emulsiones cosméticas son:

- 1) Emulsificantes. Son sustancias que contienen en su molécula una parte lipofílica y otra hidrofílica, lo que permiten hacer mezclas homogéneas, emulsiones de sustancias oleosas o cerosas en agua, para dispersar sólidos en líquidos o dispersar líquidos insolubles en otros líquidos.

Algunos ejemplos de estos materiales son el monoestearato de polietilén sorbitan (Tween 20), monooleato de polietilén sorbitan (Tween 80), monooleato de sorbitan (Span 80).

- 2) Emolientes. La palabra emoliente viene de la palabra "emolier", que en latín significa ablandar. El término "Emoliente" se refiere a los aditivos empleados en preparaciones cosméticas para suavizar y prevenir la sequedad de la piel. En general, los emolientes son empleados para proporcionar suavidad, tersura y protección a la piel.(2)

El efecto de emoliencia se basa en la formación de una delgada película grasa que cubra la superficie cutánea, la suavice y retarde la evaporación del agua. Algunos ejemplos son: parafina líquida, ciclometicones, aceite de jojoba, monoestearatos de glicerilo etoxilados, miristato de isopropilo, lanolina y derivados.(2)

- 3) Humectantes. Los humectantes son los constituyentes que incrementan el contenido de humedad en la piel y previene la pérdida de esta. Un

humectante ayuda a la preparación a retener humedad deteniendo la lenta evaporación del agua de la emulsión y bajando el punto de congelación, de este modo mejoran la resistencia de la emulsión a deterioramiento. (18)

Los humectantes comunmente empleados son polioles, tales como sorbitol, propilen glicol, glicerol y polietilen glicol. Estos son usados en un rango de concentración del 2 al 5 por ciento. (18)

- 4) Espesantes. La viscosidad de una emulsión puede incrementarse de dos maneras: incrementando la viscosidad de la fase externa (se puede aplicar a sistemas aceite en agua y agua en aceite) o incrementando la viscosidad de la fase interna (se aplica a sistemas aceite en agua solamente). (18)

Los espesantes empleados son muy variados y pueden ser ceras, alcohol cetílico, ácido esteárico, carbopol, carboximetil celulosa.

- 5) Sustancias activas. Dependiendo de la finalidad cosmética de la preparación éstas pueden ser: agentes protectores solares, extractos de animales o vegetales, vitaminas y otros.
- 6) Antioxidantes. El empleo de estos materiales se fundamenta en evitar principalmente la oxidación de los ácidos grasos de la preparación; algunos de estos son: ácido ascórbico, butil hidroxianisol, sulfito de sodio y otros.(2)
- 7) Agua. Esta puede ser la fase externa o la fase interna y es un vehiculo en la preparación; debe estar libre de residuos de sales minerales

para evitar depósitos de estos ó precipitación posterior y microbiológicamente aceptable.(2)

8) Perfume. El perfume tiene la finalidad de dar olor agradable a la preparación ó enmascarar algún olor desagradable propio de la formulación; o bien, reafirmar la finalidad cosmética por medio de su aroma.(2)

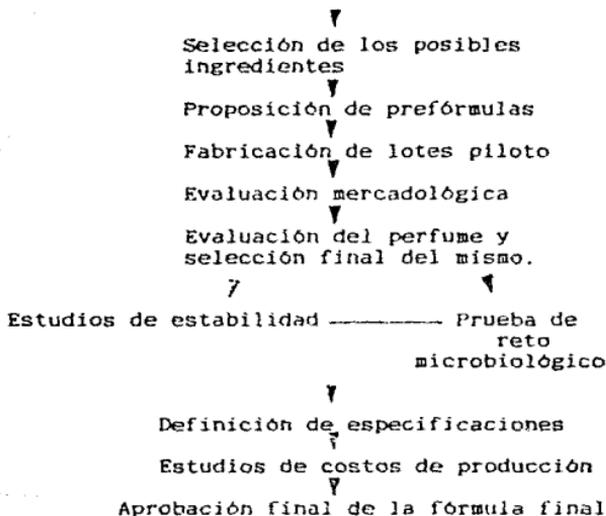
9) Sistema preservativo. Toda emulsión requiere un sistema preservativo para prevenir el crecimiento de microorganismos que pueden contaminar el producto. El sistema preservativo se estudiará a fondo en el punto C.

3. Pasos a seguir en el desarrollo de la formulación.

El desarrollo de una formulación cosmética empieza desde su definición y viabilidad técnica y mercadológica, de acuerdo a las necesidades del mercado para llenar las expectativas del cliente.

Una vez definido que producto cosmético se va a desarrollar y que función cosmética debe conferir la formulación, los pasos a seguir pueden ser los siguientes:

Esquema 1. Pasos a seguir en el desarrollo de una formulación cosmética.



4. Propuesta de fórmula. La formulación es una loción facial regenerativa; esta confiere a la piel una sensación de tersura y suavidad, además de tener propiedades regenerativas y humectantes sobre la piel.

FASE A	%
Agua desmineralizada.....	82.5
Carbopol 934.....	0.2
Sorbitol al 70%.....	4.0
D-Pantenol.....	0.8
Conservador.....	cbp

FASE B	
Trietanolamina.....	0.2

FASE C	
Acido esteárico.....	2.0
Monoestearato de gliserilo autoemulsificabi.....	1.5
Aceite de jojoba.....	2.0
Aceite de lanolina.....	1.5
Miristrato de isopropilo.....	2.0
Base de absorción líquida.....	0.5
Tween 20/Span 60 (60/40).....	0.5
Conservador.....	cbp

FASE D

Proteodermin.....	2.0
Perfume.....	0.3

5. Ingredientes activos

- a. D-Pantenol. El pantenol es la forma análoga del ácido pantoténico, constituyente de la acetilcoenzima A, la cual se encuentra íntimamente relacionada con el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas; para la obtención de energía.(4)

Se le conoce también como alcohol pantoténico o polivitamina B5 y pertenece al grupo de vitaminas hidrosolubles del complejo B. Es un líquido transparente y viscoso a temperatura ambiente y prácticamente incoloro.(4)

El pantenol al ser una molécula pequeña puede atravesar fácilmente la piel proporcionando a la misma:

- Desinflamación de tejidos
- Sanado de grietas en el pezón

- Efecto bacteriostático
- Prevención del eritema solar y protección contra los rayos ultravioleta.
- Aceleración de la regeneración celular.

Además, debido a su propiedad higroscópica, es capaz de devolver a la piel tersura, suavidad y elasticidad sin dejar sensación grasosa o pegajosa. (4)

- b. Jojoba. El aceite de jojoba, que realmente es cera líquida, está formada por esteroides de alto peso molecular, así como de ácidos y alcoholes de cadena larga no saturada. El aceite es químicamente más puro que muchas sustancias naturales, por lo que después de una refinación simple ya no contiene resinas, alquitrán, alcaloides o gliseridos; y sólo quedan restos de cera saturada, esteroides, tocoferoles e hidrocarburos. (1)

El aceite de jojoba es usado como aceite cosmético, ya que se ha demostrado que no es tóxico ni irritante. El aceite de jojoba se absorbe rápidamente por la piel y es miscible con su sebo.

El aceite de jojoba provee emoliencia ya que deja una fina capa sobre la piel controlando así la evaporación de agua, y le imparte una suavidad aterciopelada y un tacto no graso. También puede tener un efecto antiinflamatorio bajo ciertas condiciones. Dado su similitud con el sebo humano, en algunos desarrollos es usado para ayudar al control de acumulación de sebo en el acné.(4)

- c. Proteodermin. Está constituido por un proteoglicano solubilizado que se obtiene por un proceso de extracción, a partir de tejido animal no degradado. Los proteoglicanos son macromoléculas complejas

formadas por una proteína portadora ("protein core") la cual se une covalentemente a diferentes cadenas de glicosaminoglicanos en cantidad variable.(15)

Los proteoglicanos son componentes dinámicos que intervienen en procesos biológicos como la proliferación, reconocimiento y diferenciación celular.(15)

El proteodermin es capaz de restablecer las células epidérmicas por estimulación, al mismo tiempo que es capaz de aumentar el metabolismo de los componentes de tejido conjuntivo que conduce a una recuperación de las funciones de la piel. En cuanto a necesidades fisiológicas.(15)

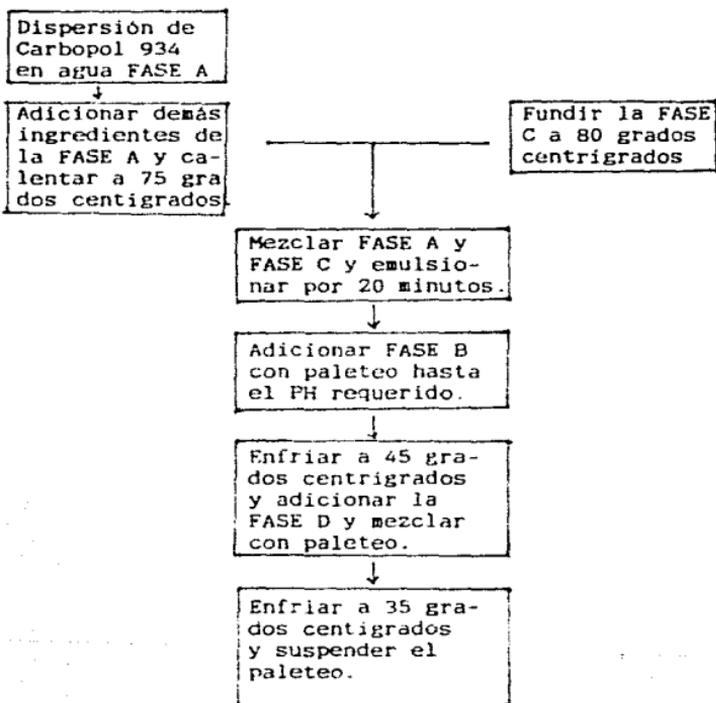
6. Especificaciones

Color:	Blanco, similar al estandar.
Olor:	Característico, similar al estandar.
Apariencia:	Semisólido de baja viscosidad, libre de partículas extrañas.
PH (21 C):	6.8 - 7.2
Viscosidad (21 C):	4,500 - 5,000 cps

Cuenta total de microorganismos incluyendo hongos y levaduras patógenos:	200 colonias/gramo. Negativo.
--	----------------------------------

7. Método de manufactura

Esquema 2. Método de manufactura de una loción facial:



C. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS EN EL DESARROLLO DE UN COSMÉTICO

1. Responsabilidades de un laboratorio de microbiología. Uno de los problemas al que nos enfrentamos en la manufactura de un cosmético en todas sus etapas, es el riesgo de contaminación microbiológica, por lo que se debe llevar a cabo un control microbiológico estricto en cada una de las etapas de manufactura de un cosmético para ofrecer un producto confiable y de calidad.(11) Por lo que el laboratorio de microbiología tiene las siguientes responsabilidades:

- a. Monitorear el contenido de microorganismos de todos los pasos en la manufactura de un cosmético.
- b. Monitorear el contenido de microorganismos del agua desmineralizada empleada en la manufactura.
- c. Muestrear los equipos de manufactura, equipos de llenado y superficies ambientales de estas

áreas de trabajo para verificar que estén libres de contaminación microbiológica.

- d. Monitorear el aire y filtros de los sistemas de comprensión de aire que remueven el polvo y material extraño de los componentes de empaque.
- e. Realizar contenido de microorganismos de los materiales (materias primas y envases) cuando son recibidos dentro de la planta.
- f. Realizar el contenido de microorganismos de muestras de lotes de manufactura y producto terminado para asegurar su buena calidad.
- g. Realizar prueba de reto microbiológico de nuevas fórmulas y de fórmulas actuales o de línea para determinar la eficacia de sus sistemas preservativos para establecer si estos productos están preservados adecuadamente para resistir condiciones de uso normal.

- h. Realizar identificación de microorganismos contaminantes y establecer si son patógenos.
- i. Validar las técnicas empleadas para la realización de los puntos anteriores.

2. Origen y tipos de contaminación microbiana. Muchos problemas de contaminación microbiana encontrados en el producto final pueden ser trazas de el agua. (16)

Algunos problemas de contaminación es la sanitización inapropiada de tanques de manufactura, válvulas, mezcladores y equipo de llenado, así como tubería y bombas; además, del aire y filtros de los sistemas de compresión de aire que remueven el polvo y material extraño de los componentes de empaque pueden proveer excelente crecimiento potencial de microorganismos. (16)

Sin embargo, uno de los motivos principales al encontrar un producto cosmético contaminado es la

inadecuada elección del conservador en el producto, por lo que el estudio de la eficacia del conservador se considera un ensayo de gran importancia para asegurar que la fórmula del preparado sea la correcta y por ello se brinde al usuario un producto de calidad.(9)

La clase predominante de contaminantes de un producto cosmético son microorganismos aerobios gramnegativos, estos, son los contaminantes de un 98% de los productos.(22)

Las Pseudomonas son las más proliferantes y en base a la experiencia en algunos laboratorios, la que más frecuentemente se encuentra es la Pseudomona cepacia y la Pseudomona putida. También se han encontrado frecuentemente la Pseudomona aeruginosa y Pseudomona maltophila.(22)

Otros microorganismos frecuentemente encontrados son Hafnis, Enterobacter cloacae, Serratia marcescens, Citrobacter, Moraxella y Klebsiella pneumoniae.(22)

Se ha reportado frecuentemente contaminación de levaduras y hongos, entre las más comunes encontradas son Aspergillus y Penicillium y variedades de Candida. (22)

Los microorganismos gram positivos (Staphilococcus aureus) raramente exceden de los 10^3 microorganismos por gramo de producto. (22)

3. Componentes de las formulaciones y su influencia microbiológica. Las materias primas cosméticas pueden ser sustratos para el crecimiento microbiano cuando están en sistemas acuosos y las características fisicoquímicas de la fórmula y la prefórmula determinan si se precisan conservadores químicos para prevenir el desarrollo de organismos contaminantes.

Los microorganismos deben tener agua para desarrollarse, necesitan agua para disolver los sustratos, hidratar las enzimas y para transportar materiales de una célula a otra, por lo tanto, diferentes microorganismos requieren diferentes cantidades de agua. (5)

Frazier y Westhoff indicaron que los factores que afectan las necesidades de agua disponible de los microorganismos incluyen el tipo de solutos presentes, el valor nutritivo de los solutos presentes, el valor nutritivo de los sustratos disponibles, la temperatura, el oxígeno, el PH y la presencia de inhibidores. (8)

Dado que las bacterias, las levaduras y los hongos crecen generalmente en la fase acuosa de los cosméticos, el problema de conservación se puede reducir a tener suficiente conservador en la fase acuosa para que el producto se autoesterilice. (8)

Los emulsionantes generalmente actúan conjuntamente con un conservador y se convierten en parte de un sistema de conservación de un producto, excepto los iónicos (como el monooleato de polietilen sorbitan) que generalmente no son antibacterianos a la concentración usada, además de disminuir la eficacia del conservador debido a los puentes de hidrógeno o solubilización de éstos

dentro de las micelas. Aunque los conservadores retenidos en las micelas de surfactantes no están disponibles para impedir el crecimiento microbiano, pueden actuar como reservas de conservantes para la fase acuosa del sistema.(8)

El adicionar materias primas de origen natural que intervienen como principios activos en productos cosméticos tales como: elastina, colágeno, hidrolizados de proteína, aloe vera, extractos de tejidos animales, extractos vegetales, proteoglicanos y otros, hace más difícil su conservación porque estas materias son altamente nutritivas para los microorganismos y/o pueden inactivar una parte del sistema de conservación. Los ingredientes que pueden afectar el sistema de conservación de un producto (efectos antimicrobianos aditivos o sinérgicos) son los siguientes:

- a. Conservadores, antibióticos.
- b. Ácidos y álcalis.

- c. Alcoholes (Etilico, isopropilico, bencilico y otros).
- d. Detergentes catiónicos (cloruro de cetil trimetil amonio) y detergentes aniónicos (lauril sulfato de sodio).
- e. Esteres (monoestearato de glicerilo).
- f. Humectantes (Glicerina, propilenglicol, sorbitol).
- g. Solutos en agua (Dextrinas, azúcares, sales).
- h. Antioxidantes fenólicos (Butil Hidroxianisol).
- i. Agentes quelantes (Etilendiamino tetra acetato de sodio).
- j. Colorantes y perfumes.

4. Selección de los conservadores. El objetivo es seleccionar el sistema más apropiado así, como sus concentraciones, y los pasos a seguir son los siguientes:
- a. Revisar la fórmula para determinar qué conservadores serán más efectivos y qué microorganismos servirán para el ensayo (Prueba de reto microbiológico).
 - b. Preparar muestras del producto que se ensaya con diferentes concentraciones del conservador y las concentraciones elegidas deben incluir niveles inadecuados (0%), concentraciones a las que se espera protegerá la fórmula y niveles que se piensa son mayores de los requeridos.
 - c. Evaluar el sistema conservador (Prueba de reto microbiológico).

- d. Formular el producto usando la concentración seleccionada de acuerdo al resultado del reto y someterla a ensayo para verificar la eficacia antimicrobiana predicha.
 - e. Finalmente, se someten pruebas del producto en los envases terminados a ensayos de estabilidad para determinar que efectivamente el sistema de conservador es eficaz.
5. Frecuencia de uso de conservadores en fórmulas cosméticas según la Fud and Drug Administration 1990 (12). Se presenta una lista de mayor a menor uso de los diez primeros conservadores de mayor uso:
- a. Hidroxibenzoato de metilo.
 - b. Hidroxibenzoato de propilo.
 - c. Imidazolidinilurea (Biopure 100, Germal 115).
 - d. Hidroxibenzoato de butilo.

- e. Hidroxibenzoato de etilo.
 - f. Metil isotiazolinona.
 - g. Cloro metil isotiazolinona.
 - h. Cuaternario-15 (Isomero cis de 1-(3-cloroalil) -3,5,7-triaza-1-cloruro de azoniada-mantana.
 - i. Diazolidinilurea.
 - j. Triclosan.
6. Factores que influyen en la eficacia de un conservador. Para obtener un producto cosmético donde el conservador se encuentra correctamente formulado, se debe tener en cuenta los factores que influyen en su eficacia:
- a. La presencia de ingredientes hostiles. El alcohol, tensoactivos catiónicos, agentes quelantes y algunos aceites esenciales, aumentan la acción conservante; el

- propilenglicol en concentración de 10 a 20% en una formulación permite prescindir del conservador.(9)
- b. pH de los productos. Por ejemplo la actividad óptima de los hidroxibenzoatos está entre pH 3 y 8.(9)
- c. El tipo de formulación del cosmético. Las emulsiones aceite en agua son generalmente más difíciles para preservar que las emulsiones agua en aceite, dando éstas últimas, problemas para su evaluación.(9)
- d. El uso de emulsificantes y/o tensoactivos. El emulsificante o tensoactivo usado, puede interferir directamente con la acción antimicrobiana de un preservativo. Las interacciones entre tensoactivos etoxilados y preservativos fenólicos es un ejemplo.(9)

La concentración del emulsificante o tensoactivo puede ser lo bastante alta para atrapar el preservativo en las micelas del tensoactivo evitando que actúe efectivamente contra los microorganismos. Este efecto es menos pronunciado con productos no fenólicos y preservativos altamente solubles en agua.(9)

- e. Interacción física o química. Sólidos suspendidos como carbón o ciertos minerales tienden a absorber muchos preservativos y entonces reducen y/o eliminan su efectividad; también la presencia de proteínas y otros materiales orgánicos pueden tener el mismo efecto.(9)
- f. Coeficiente de partición. Un preservativo que presente solubilidad en agua y aceite, se repartirá entre la fase de agua y la fase de aceite en un sistema de emulsión. La cantidad relativa del preservativo fraccionado entre la fase acuosa determina el

coeficiente de partición. Los ingredientes que aumentan el coeficiente de partición de los hidroxibenzoatos causan una disminución en la actividad de éstos. Contrariamente ingredientes que disminuyen el coeficiente de partición de los hidroxibenzoatos causan un incremento de actividad de éstos. (9)

g. Procesos y condiciones de manufactura. Preservativos como ácido sórbico y los hidroxibenzoatos, son inestables y pueden ser inactivos bajo ciertas condiciones de temperatura y/o pH. (9)

7. Características de los conservadores. Los requerimientos esenciales de un sistema preservativo para que se considere como ideal son los siguientes:(2)

- No debe producir efectos tóxicos ni irritantes a las concentraciones usadas en la piel y membranas mucosas.
- Debe ser estable al calor y almacenamiento prolongado.

- No debe ser incompatible con los otros ingredientes de la fórmula.
- Ser activo a bajas concentraciones.
- Efectivo en un amplio margen de pH.
- Efectivo contra un amplio rango de microorganismos.
- Ser rápidamente soluble en su concentración efectiva, en una de las fases.
- No producir olor ni color en la preparación.

A continuación se mencionan las características y las concentraciones recomendadas para uso cosmético de los principales conservadores empleados:

- a. Imidazolidinilurea. Es un polímero derivado de la Imidazolidinilurea dotado de propiedades antimicrobianas y de características peculiares, que le convierten en un conservador de elección en las formulaciones cosméticas y de dermofarmacia.

Este conservador es activo sobre bacterias Gram-Positivas, Gram-negativas y levaduras y presenta sinergismo con productos de acción antifúngica específica, tales como paraoxibenzoatos, fenoxetol, sorbato y otros. Es soluble en agua y el pH óptimo de acción es entre 3 y 9; además es compatible con todos los ingredientes cosméticos incluyendo proteínas, colágenos solubles, aloe vera y extractos de plantas (21).

La concentración recomendada es 0.05 a 0.5 a la cual no es tóxico, ni irritante.

- b. Dimetil oxazolidina. Es un conservador especialmente destinado para uso en productos cosméticos. Es efectivo contra un amplio espectro de microorganismos en un amplio rango de pH, de 6 a 9 aproximadamente.

También es efectivo como una agente amortiguador de pH y como un inhibidor de la corrosión en algunos sistemas acuosos. La

concentración recomendada es de 500 a 2000 ppm en la formulación final.

La Dimetiloxazolidina es compatible con sistemas catiónicos o no iónicos. Como es soluble en ambos, aceite y agua, éste presenta partición entre las fases de aceite-agua en las emulsiones.

Estudios toxicológicos con Dimetiloxazolidina usado a concentraciones de entre 500 hasta 2000 ppm, indican que no tiene efectos tóxicos; sin embargo, estudios del producto sin diluir indican que éste es severamente irritante. (13)

- c. Hidroxibenzoatos (Metil, etil, propil, butil, hidroxibenzoatos). El espectro de actividad es principalmente hongos y bacterias gram-positivas.

La concentración máxima recomendada es de 0.3%; son parcialmente solubles en agua y el pH óptimo de acción es de 3.8 a 8.0; son incompatibles con surfactantes no iónicos y catiónicos. Poseen un infavorable coeficiente de partición entre las fases de aceite y agua de las emulsiones. No son tóxicos, ni irritantes en las concentraciones recomendadas. (2)

D. PRUEBA DE RETO MICROBIOLOGICO

El ensayo de reto microbiológico se efectúa en los diferentes estadios de desarrollo de la fórmula para servir de guía a los químicos formuladores en la concepción de un producto microbiológicamente seguro y estable. El objetivo del ensayo es determinar los tipos y concentraciones mínimas de los conservadores requeridos para impedir la contaminación microbiana, desde la manufactura del producto hasta que sea usado por el consumidor. (8)

La prueba de reto es una parte integral del desarrollo de una nueva formulación cosmética. Esta prueba también se utiliza para modificar un producto existente. Esta prueba es usada para determinar si un sistema conservador incorporado dentro del producto es adecuado. (11)

Si el número de microorganismos adicionados en la muestra prueba permanece constante o incrementa, entonces el producto no está preservado adecuadamente; en una formulación bien preservada, el número de microorganismos puede ser reducido a niveles aceptables dentro de un tiempo límite especificado. (11)

Se preparan 5 muestras prueba, 4 se inoculan con cada uno de los siguientes microorganismos indicadores: Pseudomona aeruginosa y Escherichia coli (Bacterias gram-negativas), Staphylococcus aureus (Bacterias gram-positiva), Aspergillus niger (Hongo) y una muestra no es inoculada (control). Estos microorganismos representan los contaminantes más frecuentes en materias primas, productos contaminados y del medio ambiente de manufactura. (11)

Las muestras cosméticas se inoculan con el microorganismo de reto. El número de microorganismos en el inoculo puede ser aproximadamente 10^6 - 10^7 microorganismos por gramo de producto para especies de bacterias y 10^4 - 10^7 microorganismos por gramo de producto para especies de hongos. (11)

Estas muestras se mantienen a temperatura ambiente y semanalmente se siembran durante 4 semanas para determinar la eficacia del sistema preservativo. El tipo y número de algún microorganismo sobreviviente puede determinar la necesidad de un ajuste del sistema preservativo.

1. Pautas de límites microbiológicos. Las pautas de límites microbiológicos para cosméticos y productos de tocador, indican que los cosméticos para empleo por el público en general "no precisan de ser fabricados con materias primas estériles, o en condiciones de asepsia".(8)

Una consideración importante a tener en cuenta en el desarrollo de una fórmula es determinar si puede ser fabricado sin comprometer su integridad microbiológica. Es necesario que el químico formulador, el microbiólogo, el personal de fabricación y los responsables de control de calidad pasen revista a las especificaciones de las materias primas, a los métodos de laboratorio, a los procedimientos de fabricación, a los programas de limpieza y sanitización y a las especificaciones de los productos terminados, para determinar si el departamento de fabricación es capaz de hacer un producto de acuerdo con los procedimientos escritos para fórmulas y prefórmulas. Las inspecciones microbiológicas deben ser parte de las operaciones de control de cada lote para conocer la calidad microbiológica

en varios puntos de fabricación. Finalmente, el examen microbiológico de un producto terminado revela el cumplimiento de sus especificaciones.(8)

La pauta con los límites microbiológicos de la Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc. (CIFA) para cosméticos recomienda el siguiente criterio específico:

- Productos para bebés: no más de 500 microorganismos por gramo.
- Productos a emplear alrededor de los ojos: no más de 500 microorganismos por gramo.
- Todos los demás productos: no más de 1000 microorganismos por gramo.
- Además, dicha pauta estipula que "ningún producto contendrá microorganismos patógenos".

2. Características de los microorganismos indicadores.

Es importante asegurar que las cepas de los microorganismos indicadores se mantengan puras para que los datos obtenidos en la prueba de reto microbiológico, sean confiables, para este fin se deben conocer las características de cada uno de los microorganismos y así poder identificarlos adecuadamente. A continuación se presentan sus principales características.

- a. Staphylococcus aureus. Son cocos gram-positivos, son aerobios o anaerobios facultativos y la familia a la que pertenecen es Micrococcaceae.

Los cocos están dispuestos en racimos o apiñamientos irregulares semejantes a los de uvas. Crecen bien en medios simples, la temperatura óptima para su desarrollo es de 36 grados centígrados y el pH óptimo es de 7.4; los Staphylococcus crecen bien en medios que contienen 10% de Cloruro sódico; por lo tanto, el medio denominado "agar con sal y

"manitol" se puede utilizar para su diferenciación; las colonias en este medio son doradas y se acidifica el medio. En agar con sangre, a las 24 horas a 37 grados centígrados, las colonias son circulares y producen hemólisis. En agar Vogel-Johnson con telurito al 1% las colonias son negras, rodeadas de zonas amarillas.(3)

- b. Escherichia coli. Son bacilos anaerobios facultativos, gram-negativos; pertenecen a la Familia de las Enterobacteriaceae.

Los miembros de esta especie se desarrollan en medios ordinarios; el crecimiento óptimo ocurre a temperatura entre 20 y 40 C y en pH entre 6 y 8. Para su diferenciación se puede utilizar agar con Eosina y azul de metileno desarrollándose colonias con brillo metálico bajo luz reflectada y negro azulado bajo luz transmitida, o bien agar Mac conkey en donde las colonias adquieren un color rosa pálido.(3).

- c. Pseudomona aeruginosa. Son bacilos aerobios de la Familia de las Pseudomonadaceae; son aerobios gram-negativos.

Este microorganismo es fácil de reconocer debido su brillo metálico verde azulado y su olor a humedad. Sobre agar cetrinida las colonias son verde fluorescente y da positivo a la prueba de citocromo oxidasa. (3)

- d. Aspergillus niger. Este microorganismo pertenece a la clase Deuteromycetes y al orden Sphaeropsidales, su reproducción es asexual, tienen hifas septadas y producen conidios, de esterigmas en forma de frasco, sobre conidióforos anchos, con forma de vesícula. En agar Sabouraud con dextrosa a 25 grados centígrados, su crecimiento es rápido. Al principio es blanco y filamentosos, conforme ocurre la esporulación la colonia adquiere color negro con crecimiento elevado al centro. (3)

3. Criterio de aceptación/rechazo de la prueba de reto.

En la prueba de reto microbiológico, la efectividad del sistema preservativo es determinada por una recuperación de menos que el 0.1% (99.9% de muerte) del inóculo original después de una semana y por periodos extensivos del tiempo.(19)

III. OBJETIVOS, PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPOTESIS

A. OBJETIVOS

1. Implementar la prueba titulada "Prueba de reto microbiológico" e integrarla como parte del desarrollo de un producto cosmético.
2. Dar a conocer la investigación necesaria en el desarrollo de un cosmético y quiénes intervienen en dicha investigación.
3. Realizar el estudio de reto microbiológico a la loción facial regenerativa y establecer el sistema preservativo más eficaz.

B. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los problemas al que nos enfrentamos en la producción de un cosmético en todas sus etapas, es el riesgo de contaminación microbiológica, por lo que se debe llevar a cabo un control microbiológico en cada una de las etapas de la producción de un cosmético para ofrecer un producto confiable y de calidad.

El control microbiológico es muy importante ya que los productos se aplican directamente en la piel, cabello y área de los ojos. Un producto contaminado representa un riesgo de salud para el consumidor, además de representar pérdidas monetarias para la empresa productora y desvirtuar su imagen.

Por lo anterior, nace la necesidad de realizar una prueba que sirva de guía en la concepción de un producto microbiológico seguro y estable, ya que no sólo basta el control microbiológico estricto. Esta prueba se denomina "Prueba de reto microbiológico" y consiste en retar el sistema preservativo con los microorganismos que representan los contaminantes más frecuentes.

La prueba de reto microbiológico debe ser una prueba preventiva para evitar una contaminación microbiológica del producto en cualquier etapa de su producción, en su almacenamiento o durante su uso por el consumidor, por lo que ésta debe ser integrada cuando se esté desarrollando la formulación del producto.

C. HIPOTESIS

Los cosméticos por contener materia orgánica y elevados contenidos de agua, son susceptibles a contaminarse con bacterias, levaduras y hongos saprófitos; siendo más susceptibles aquellos que se elaboran con materias primas altamente nutritivas como el colágeno, elastina, proteínas hidrolizadas, proteoglicanos, extractos vegetales y almidones.

La prueba de reto microbiológico nos sirve para encontrar los tipos de conservadores y las concentraciones óptimas para las necesidades de cada formulación cosmética en específico y en resumen, el sistema conservador eficaz.

IV. MATERIAL, EQUIPO, SUSTANCIAS, REACTIVOS Y METODOS

A. MATERIAL

1. Tubos de ensaye 15 x 1.5 cm. de diámetro.
2. Tapas bacteriológicas de acero inoxidable.
3. Asas bacteriológicas y portaasas.
4. Botellas de dilución de 120 ml boca ancha, con aforo a 100 ml.
5. Pipetas serológicas graduadas de 2 ml, 5 ml y 10 ml.
6. Abatelenguas de madera.
7. Cinta reveladora de esterilidad.
8. Tubos de centrifuga graduados de 12 ml.
9. Gradilla de acero inoxidable.
10. Algodón y gases estériles.

11. Cajas petri desechables de 100 x 15 mm.
12. Matraz bola fondo plano de 1000 ml, 500 ml y 250 ml.
13. Marcador negro y rojo.
14. Embudo con tallo corto estéril.
15. Pipetero de acero inoxidable.
16. Mechero Bunsen.
17. Portaobjetos.
18. Frascos contenedores de vidrio.
19. Guantes de asbesto.

B. EQUIPO

1. Espectronic 20 de 340 a 960 nm.
2. Estufa de cultivo Modelo: EC-71.

3. Autoclave Modelo popular No. SIC DGE 4396.
4. Agitador Vortex Thermolyne maxi mix.
5. Microscopio Switt No. 8177084.
6. Cuenta colonias Q-14.
7. Campana de flujo laminar Veco FL 2414.
8. Balanza digital Galaxy TM 4000 D.
9. Baño maría 100 tubos, temperatura entre 20-60 grados centigrados Modelo BM 1002.

C. SUSTANCIAS Y REACTIVOS

1. Agar azul de metileno - eosina (EMR).
2. Agar cetrimida.
3. Caldo nutritivo.

4. Agar nutritivo.
5. Agar de dextrosa Sabouraud.
6. Agar Vogel-Johnson.
7. Solución de cristal violeta 2.0%.
8. Solución de safranina 0.5%.
9. Lugol.
10. Solución alcohólica-acetona (30-70%).
11. Aceite de inmersión.
12. Cepa de Escherichia coli.
13. Cepa de Staphylococcus aureus.
14. Cepa de Pseudomonas auruginosa.
15. Cepa de Aspergillus niger.

16. Agua destilada.

D. METODOS

1. Procedimiento de prueba de reto microbiológico. A cada fórmula se le puede hacer la prueba de la eficacia del preservativo. En general la prueba consiste en:

- Una fórmula para ser retada.
- Microorganismos para el reto.
- Un método consistiendo de dos retos, a semana 0 y semana 2.
- Cinco puntos de ensayo.
- Criterio pasa / no pasa.

El procedimiento paso a paso es como sigue:

- a. Preparación de organismos (Ver el procedimiento de mantenimiento y estandarización del microorganismo).
- b. Dividir cada producto en 5 muestras de 100 g. pesando el material en frascos contenedores.

- c. Cada muestra se etiqueta con la información apropiada incluyendo nombre del producto, número de fórmula, dato de iniciación de la prueba y nombre del microorganismo inoculado.

- d. Simultáneamente se colocan todos los grupos de muestras para la prueba (5 para cada fórmula) en una caja o canasta identificada con toda la información.

- e. Inocular 4 de 5 muestras con el microorganismo apropiado (Ver método de inoculación).

- f. Mantener la quinta muestra como un control no inoculado. Este control no inoculado hace posible reconocer problemas de contaminación de otras fuentes como son: ingredientes usados en la formulación, contaminación durante la manufactura de la formulación (pobre sistema preservativo), contaminación durante el ensayo microbiológico de las muestras.

En resumen cada prueba consiste de un control no inoculado, con 3 muestras bacteriales y una fúngica.

2. Procedimiento de inoculación

- a. Un mililitro de una dilución $10^6 - 10^7$ microorganismos por mililitro del microorganismo bacterial, se adiciona dentro de cada una de las 3 muestras correspondientes usando una pipeta estéril.
- b. Un mililitro de una suspensión de esporas $10^4 - 10^5$ microorganismos por mililitro del microorganismo fúngico se adiciona dentro de una de las muestras.
- c. Cada muestra se mezcla después de la inoculación. En el caso de una crema o un líquido espeso se utiliza un abatelenguas de madera estéril para agitar la muestra. Los líquidos fluidos se agitan vigorosamente.

- d. El procedimiento se repite a la semana 2 pero ahora, se adiciona 0.8 ml. de la dilución 10^6 - 10^7 microorganismos por mililitro del organismo bacterial y 0.8 ml de la dilución 10^4 - 10^5 microorganismos por mililitro del microorganismo fúngico de una de las muestras.
- e. La muestra control, no inoculada, se siembra a la semana 0 y las 5 muestras se siembran a cada semana durante las siguientes 4 semanas. (Semanas 1, 2, 3 y 4).

3. Preparación, mantenimiento y estandarización del microorganismo. Los cultivos para la prueba de reto, se mantienen cuidadosamente para minimizar la variación y para mantener la sensibilidad-resistencia hacia los conservadores.

Si partimos de una cepa pura activa; transferir asépticamente una asada hacia un tubo con 10 ml de caldo nutritivo estéril e incubar por 24 horas a 37 grados centigrados (cultivo puro Stock).

a. Mantenimiento del microorganismo bacterial.

- 1) Del cultivo puro, se transfiere una asada asépticamente a 2 tubos con agar nutritivo inclinado (Siembra por estria).
- 2) Los tubos sembrados se incuban por 24 horas a 37 C. Después de la incubación, los tubos se identifican, uno como cultivo A y otro como cultivo B y éstos se refrigeran.
- 3) El cultivo A se utiliza para inocular los tubos de caldo nutritivo stock (10 ml) y éstos se transfieren mensualmente.
- 4) Para asegurar que los cultivos se conservan puros, se realiza mensualmente una tinción de gram al cultivo A, y se siembra sobre agar Azul de metileno - eosina la cepa de Escherichia coli, sobre agar Cetrimida la cepa de

Pseudomona aeruginosa y sobre agar Vogel Johnson la cepa de Staphylococcus aureus.

5) El cultivo B se transfiere de agar Nutritivo inclinado a agar Nutritivo inclinado semanalmente. Cada semana se hacen 2 preparados de inclinados que son identificados como cultivo B.1 y cultivo B.2.

6) El cultivo B.1 se utiliza para el ciclo semanal y el cultivo B.2 se utiliza para la prueba de reto.

b. Preparación del inóculo bacterial para prueba reto microbiológico. Los microorganismos bacteriales para inoculación en la prueba de reto son preparados por el siguiente procedimiento:

1) Tomar una asada del cultivo B.2 y transferir asepticamente a un tubo que

contiene 10 ml de Caldo nutritivo estéril. Incubar 24 horas a 37 C (Tubo para centrifuga 12 ml.).

- 2) Centrifugar el cultivo de 24 horas en caldo nutritivo de cada microorganismo por 25 minutos a 2000 rpm.
- 3) Decantar el sobrenadante del centrifugado y las células sedimentadas son resuspendidas con 10 ml de agua destilada. Agitar en un agitador Vortex para resuspender las células en el líquido. Si las células están apretadamente empaquetadas, succionar a varios tiempos con expulsión energética contra la pared y repetir hasta obtener la suspensión de células.

c. Estandarización del microorganismo bacterial. Este paso es importante para controlar la concentración del microorganismo retado usado en la prueba. La concentración inoculada de microorganismos es controlada por

estandarización de los cultivos y es por medio de lecturas espectrofotométricas.

1) De la suspensión preparada con el cultivo B.2 tomar 5.0 ml y transferirlos a una celda para el Espectronic 20; leer la densidad óptica y si es necesario realizar una dilución para el microorganismo específico y obtener conteos viables entre 10^6 y 10^7 microorganismos/mililitro.

2) Para obtener los conteos viables, tomar 1 ml del inóculo bacterial y adicionarlo a 99 ml de agua destilada estéril contenidos en botellas de dilución con aforo a 100 ml para obtener una dilución 10^{-2} .

De la dilución anterior tomar 1 ml y adicionarlo a 99 ml de agua destilada estéril contenidas en botellas de

dilución aforadas a 100 ml para obtener una dilución 10^{-4} y así sucesivamente para obtener diluciones 10^{-6} , 10^{-8} y 10^{-10}

- 3) Sembrar 1 ml de cada dilución en agar Nutritivo y en el caso de las diluciones 10^{-6} y 10^{-8} , también sembrar 0.1 ml. y registrar el número de colonias obtenidas.

4. Mantenimiento y preparación del microorganismo fúngico.

- a. Mantenimiento de un cultivo fúngico. Contrariamente a las bacterias, los hongos se mantienen en un medio sólido. Las transferencias son efectuadas de tubo a tubo cada 14 días en agar Sabouraud.

- 1) Adicionar 5 ml de agua destilada estéril dentro de un tubo que contiene un cultivo de hongo (*Aspergillus niger*) de 14 días y remover las esporas con una pipeta estéril.

- 2) Filtrar la suspensión de esporas a través de una gasa estéril sobrepuesta en un embudo estéril y recibir el filtrado en un tubo de ensayo estéril.
- 3) Transferir 0.2 ml del filtrado a un tubo con agar Sabouraud inclinado y propagar el inóculo sobre la superficie.
- 4) Incubar a temperatura ambiente por 14 días o hasta que ocurra esporulación.
- 5) Repetir el procedimiento cada 14 días por duplicado.

b. Preparación del inóculo fúngico. La concentración fúngica usada en la prueba de reto es de entre 10^4 y 10^5 esporas por gramo de producto.

La estandarización de esta concentración es menos precisa que con cultivos bacteriales ya que los métodos espectrofotométricos no se utilizan. Se procede como sigue:

- 1) Adicionar 10 ml de agua destilada estéril dentro de un tubo que contiene un cultivo de Aspergillus niger de 14 días y remover las esporas con una pipeta estéril.

- 2) Filtrar la suspensión de esporas a través de una gasa estéril sobrepuesta en un embudo estéril y recibir el filtrado en un tubo de ensayo estéril (Inóculo fúngico).

- 3) Para obtener los conteos viables, tomar 1 ml del inóculo fúngico y adicionarlo a 99 ml de agua destilada estéril contenidos en botellas de dilución con aforo a 100 ml para obtener una dilución 10^{-2} . De la dilución anterior tomar 1 ml y adicionarlo a 99 ml de agua destilada estéril contenidos en botellas de dilución con aforo a 100 ml para obtener una dilución 10^{-3} y repetir el procedimiento para obtener una dilución 10^{-4} .

- 4) Sembrar 1 ml de cada dilución en agar nutritivo y en el caso de las diluciones 10^{-3} y 10^{-5} , también sembrar 0.1 ml y registrar el número de colonias. Repetir esta siembra por duplicado.

5. Cuenta total en placa de microorganismos aerobicos para formulaciones miscibles o dispersables en agua sometidos a la prueba de reto.

- a. Para cada muestra a ensayar marcar una caja indicando la caja que contiene el Agar nutritivo, con las letras "AN"; y otra con la letera "S", indicando la caja que contiene el Agar Sabouraud.
- b. Pesar asépticamente 11 g de la muestra a ensayar, dentro de una botella de dilución estéril, que contiene 99 ml de agua destilada estéril.
- c. Agitar hasta obtener una buena homogenización de la dispersión.

- d. Asépticamente tomar 2.0 ml de la dilución con una pipeta de 5.0 ml y liberar 1.0 ml dentro de cada una de las cajas petri etiquetadas con "AN" y "S".

- e. Adicionar asépticamente aproximadamente 15.0 ml de Agar nutritivo estéril a una temperatura de entre 45-48 grados centígrados, a la caja marcada con "AN" y rotar la caja suavemente para dispersar la muestra.

- f. Adicionar asépticamente aproximadamente 15.0 ml de Agar Sabouraud estéril a una temperatura de entre 45-48 grados centígrados a la caja marcada con "S" y rotar la caja suavemente para dispersar la muestra.

- g. Dejar solidificar el agar durante 25 minutos e incubar las cajas por 48 horas invertidas, a 37 grados centígrados. Solamente las cajas marcadas con "AN".

- h. Examinar las cajas para observar el crecimiento bacterial presente, contando las colonias usando un contador de colonia.

- i. Las cajas marcadas con "S", incubarlas a temperatura ambiente por 5 días invertidas y examinar las cajas para observar el crecimiento fúngico presente, contando las colonias usando un contador de colonias.

V. RESULTADOS

A. DETERMINACION DE LAS ABSORBANCIAS PARA CONTROLAR LA CONCENTRACION DE LOS MICROORGANISMOS BACTERIALES.

Se realizaron 8 curvas estandar a diferentes absorbancias para definir en qué rango de absorbancias se pueden obtener conteos viables entre 10^6 y 10^7 Unidades Formadoras de Colonias (UFC por mililitro).

1. Microorganismo: *Escherichia coli*.

ABSORBANCIA	DILUCIONES							
	-2	-4	-6	-7	-8	-9	-10	
420 nm	10	10	10	10	10	10	10	
0.2	I	I	I	I	255	480	180	
0.2	I	I	I	1197	504	441	63	
0.1	I	I	2600	1900	884	6	127	
0.04	I	1760	30	1	72	20	6	
0.04	I	318	45	41	10	11	6	
0.03	I	440	89	5	58	0	17	
0.03	I	250	25	14	33	13	27	
0.01	22	0	0	0	0	0	0	

TABLA I. Cuenta total de microorganismos viables de 8 curvas estandar de *Escherichia coli* a diferentes lecturas de absorbancia, en UFC/ml.

NOTA: I = INCONTABLE.

Se determinó que a una lectura de absorbancia de el inóculo tomada a 420 nm de entre 0.03 y 0.04, se pueden

obtener conteos viables de entre 10^6 y 10^7 UFC/ml de concentración para Escherichia coli, sin embargo, las lecturas están muy dispersas entre si.

2. Microorganismo: Staphylococcus aureus.

ABSORBANCIA	DILUCIONES						
	-2	-4	-6	-7	-8	-9	-10
420 nm	10	10	10	10	10	10	10
0.2	I	I	I	1320	600	210	0
0.2	I	I	I	1870	1197	504	693
0.07	I	1628	550	1	1	0	2
0.04	I	I	202	190	0	41	0
0.04	I	185	36	24	62	22	10
0.04	3072	650	40	0	4	0	1
0.03	I	850	40	32	25	16	0
0.03	I	1200	21	9	19	3	0

TABLA II. Cuenta total de microorganismos viables de 8 curvas estandar de Staphylococcus aureus a diferentes lecturas de absorbancia, en UFC/ml.

Se determinó que a una lectura de absorbancia del inóculo tomada a 420 nm de entre 0.03 y 0.04, se pueden obtener conteos viables de entre 10^6 y 10^7 UFC/ml de concentración para Staphylococcus aureus, y también, las lecturas están muy dispersas entre si.

3. Microorganismos: *Pseudomona aeruginosa*.

ABSORBANCIA	DILUCIONES								
	-2	-4	-6	-7	-8	-9	-10		
420 nm	10	10	10	10	10	10	10	10	10
0.1	I	I	I	I	225	150	75		
0.1	I	I	I	6804	7938	3402	189		
0.03	I	I	I	19	0	0	0		
0.03	I	1936	880	308	396	11	54		
0.02	748	264	23	0	1	0	0		
0.02	I	I	39	35	72	32	45		
0.01	I	500	43	9	2	0	0		
0.01	I	100	84	35	31	17	9		

TABLA III. Cuenta total de microorganismos viables de 8 curvas estandar de *Pseudomona aeruginosa* a diferentes lecturas de absorbancia, en UFC/ml.

Se determinó que a una lectura de absorbancia del inóculo tomada a 420 nm de entre 0.01 y 0.02, se pueden obtener conteos viables de entre 10^{10} y 10^7 microorganismos/ml de concentración para *Pseudomona aeruginosa*, y como con los microorganismos anteriores, las lecturas están muy dispersas entre si.

B. CONTROL DE LA CONCENTRACION PARA EL MICROORGANISMO FUNGICO.

1. Microorganismo: Aspergillus niger.

En caso de este microorganismo fúngico, no se controló la concentración por medio de la densidad óptica por lo que necesario sembrar cada dilución de la curva por duplicado para confirmar la concentración del inóculo.

		DILUCIONES				
		-2	-3	-4	-5	-6
		10	10	10	10	10
a.	I		150	50	1	0
b.	I		160	30	0	1
a.	I		95	25	5	1
b.	I		I	24	10	8
a.	I		1	5	0	0
b.	I		2	7	0	0
a.	I		23	18	21	0
b.	I		12	0	9	23
a.	I		1	23	18	21
b.	I		I	12	9	23
a.	I		16	1	2	8
b.	I		14	0	1	8
a.	I		25	9	1	0
b.	I		22	12	2	0
a.	I		25	16	1	0
b.	I		13	9	2	0

TABLA IV. Cuenta total de microorganismos viables de 8 curvas estandar de Aspergillus niger.

Se determinó que realizando una suspensión con una asada de esporas en 10 ml de agua estéril, se obtienen conteos viables entre 10^4 y 10^6 esporas/ml de concentración para Aspergillus niger.

C. DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE CORRELACION DE LAS CURVAS ESTANDAR PARA EL CONTROL DE LA CONCENTRACION DE LOS MICROORGANISMOS.

Debido a la dispersión que se observa en la cuenta total de microorganismos viables de las curvas estandar de los diferentes microorganismos a la lectura de absorbancia determinada (Para Escherichia coli 0.03, para Staphylococcus aureus 0.03 y para Pseudomona aeruginosa 0.02), se procedio a realizar las curvas por triplicado para cada microorganismo.

Para la realización de las diluciones se controlaron los siguientes parametros

1. La lectura de absorbancia del inóculo
2. El mismo tipo de pipeta (Pipetas de 2 ml serológicas)
3. El aforo a 100 ml

4. Se colocaron cajas de agar nutritivo y agar Sabouraud en diferentes puntos del área de trabajo para comprobar que se realizaran las diluciones en condiciones adecuadas de asepsia y evitar resultados erróneos.

1. Coeficiente de correlación (r) de 3 curvas estandar de Escherichia coli a una absorbancia de 0.03 a 420nm

X DILUCION	Y CURVA 1: UFC/ml	Y CURVA 2: UFC/ml	Y CURVA 3: UFC/ml	COEFICIENTE DE CORRELACION (r)
-2 1x10	I	I	I	CURVA 1: r = 0.9727
-4 1x10	336	432	380	CURVA 2: r = 0.9388
-6 1x10	13	16	12	CURVA 3: r = 0.9476
-8 1x10	4	7	4	
-10 1x10	1	2	0	

TABLA V. Cuenta total de microorganismos viables en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por milímetro de 3 curvas estandar de Escherichia coli con sus respectivos coeficientes de correlación. (Ver gráfica anexa)
I = Incontable

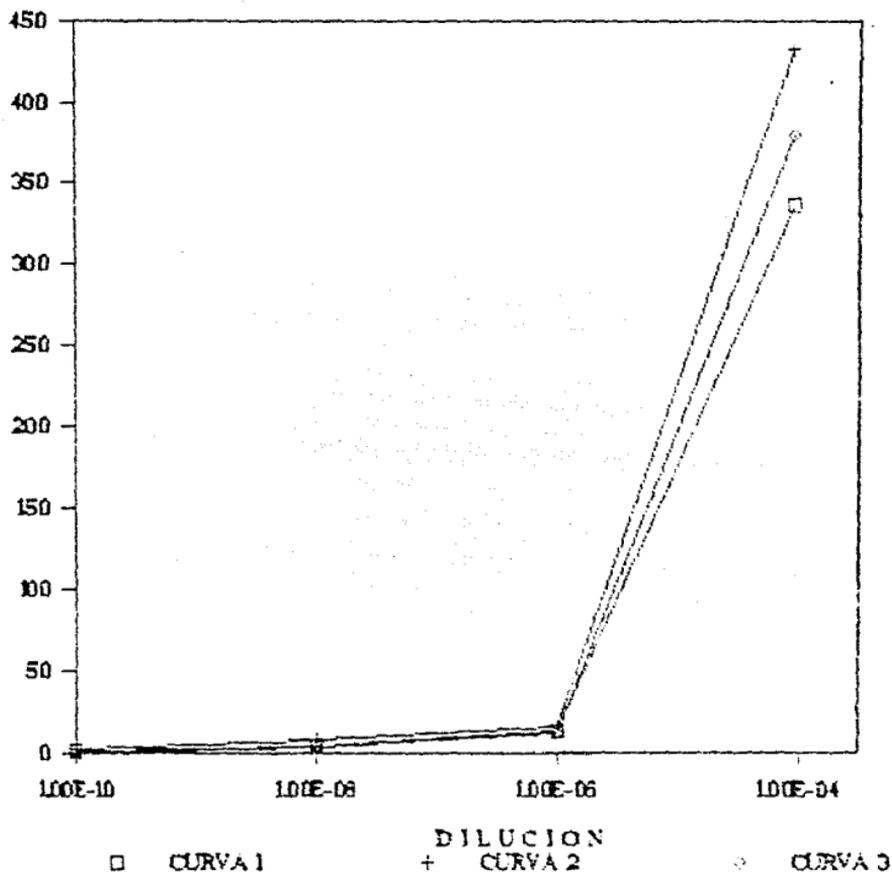


Figura 1. Gráficas de la dilución del inóculo de Escherichia coli contra Unidades Formadoras de colonias per mililitro.

2. Coeficiente de correlación (r) de 3 curvas estandar de *Staphylococcus aureus* una absorbancia de 0.3 a 420 nm.

X DILUCION	Y CURVA 1: UFC/ml	Y CURVA 2: UFC/ml	Y CURVA 3: UFC/ml	COEFICIENTE DE CORRELACION (r)
-2 1x10	I	I	I	CURVA 1:
-4 1x10	824	816	820	r = 0.9210
-6 1x10	10	8	11	CURVA 2: r = 0.963
-8 1x10	4	3	2	CURVA 3:
-10 1x10	0	1	1	r = 0.996

TABLA VI. Cuenta total de microorganismos viables en Unidades Formadoras de colonias (UFC) por mililitro de 3 curvas estandar de *Staphylococcus aureus* con sus respectivos coeficientes de correlación. (Ver Gráfica anexa).

I= Incontable

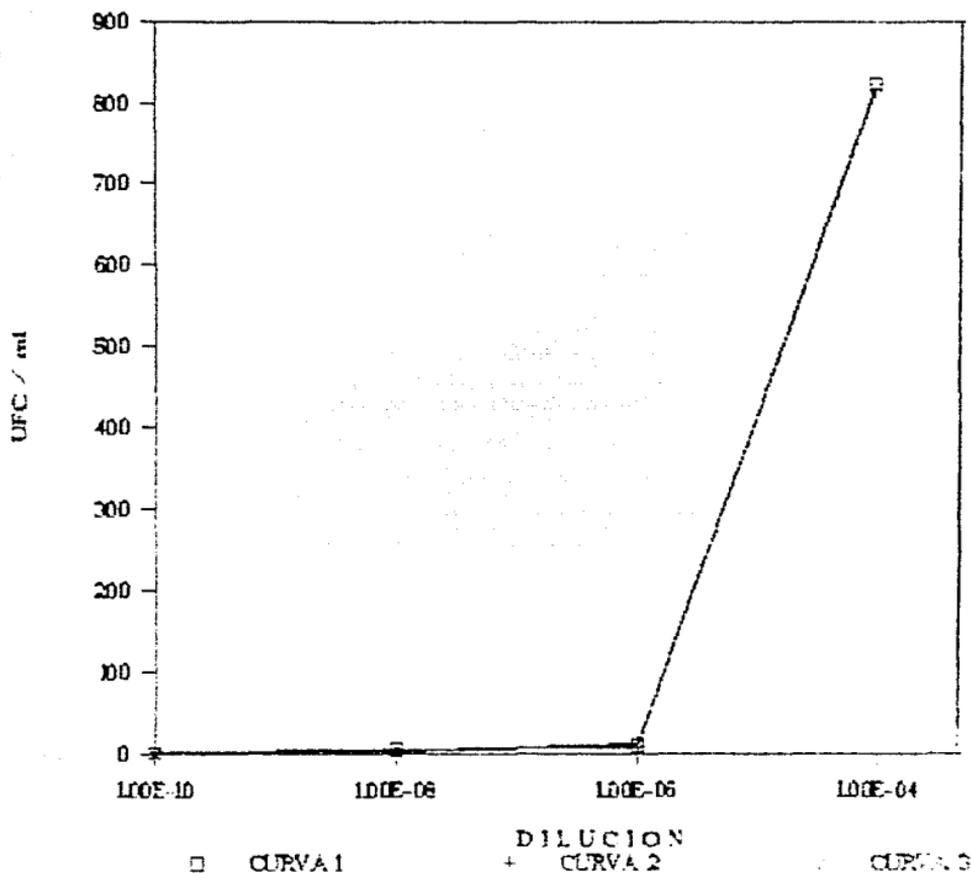


Figura 2. Gráficas de la dilución del inóculo de *Staphylococcus aureus* contra Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro.

3. Coeficiente de correlación (r) de 3 curvas estándar de *Pseudomona aeruginosa* a una absorbancia de 0.02 a 420 nm.

X	Y	Y	Y	COEFICIENTE DE
DILUCION	CURVA 1:	CURVA 2:	CURVA 3:	CORRELACION (r)
	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	
-2	I	I	I	CURVA 1:
1x10 ⁻⁴	768	772	704	r = 0.997
-6	35	26	29	CURVA 2:
1x10 ⁻⁶	4	4	6	r = 0.9977
-8	1	2	2	CURVA 3:
1x10 ⁻⁸				r = 0.9916

TABLA VII. Cuenta total de microorganismos viables en Unidades Formadoras de colonias (UFC) por mililitro de 3 curvas estándar de *Pseudomona aeruginosa* con sus respectivos coeficientes de correlación. (Ver Gráfica anexa).
I= Incontable

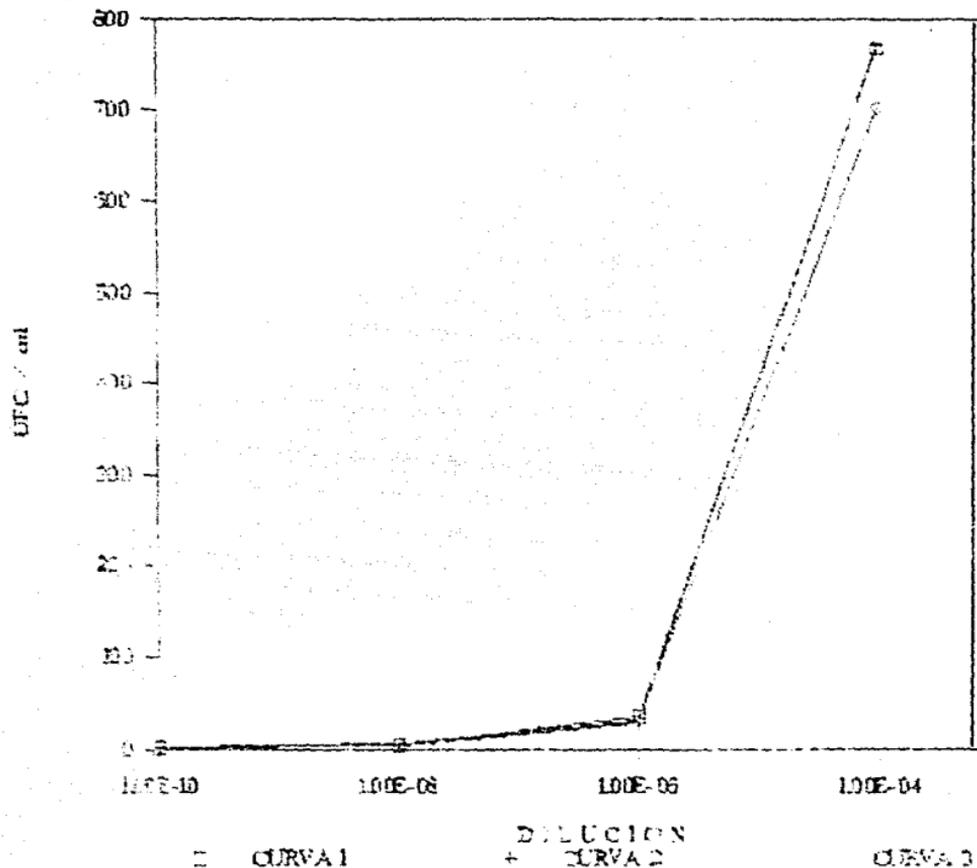


Figura 3. Gráficas de la dilución del inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* contra Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro.

En las 3 curvas elaboradas para cada microorganismos, el cálculo del coeficiente de correlación se realizó descartando la cuenta de microorganismos de las diluciones 1×10^{-2} y 1×10^{-4} ya que estos puntos están muy dispersos con respecto a los demás. Como se observa, los coeficientes de correlación obtenidos están muy cercanos lo cual significa que los valores están muy cercanamente relacionados.

D. CURVAS ESTANDAR DE LA PRUEBA DE RETO MICROBIOLOGICO
PARA LA LOCION FACIAL REGENERATIVA.

1. Semana 0: Inoculación

MICROORGANISMO	ABSORBANCIA (A) 420 nm
Escherichia coli	0.03
Staphylococcus aureus	0.03
Pseudomona aeruginosa	0.02

TABLA VIII. Absorbancia obtenida del inóculo de cada microorganismo bacterial.

MICROORGANISMOS	DILUCIONES						
	-2 10	-4 10	-6 10	-7 10	-8 10	-9 10	-10 10
E. coli	I	380	12	7	4	2	0
S. aureus	I	820	11	5	2	1	1
Ps. aeruginosa	I	772	26	8	4	3	2

TABLA IX. Cuenta total en UFC/ml de la curva estandar para microorganismos bacteriales.

MICROORGANISMOS	DILUCIONES				
	-2 10	-3 10	-4 10	-5 10	-6 10
A. niger	a. I	25	9	1	0
	b. I	22	12	2	0

TABLA X. Cuenta total de microorganismos de la curva estandar para microorganismos fúngicos.

2. Semana 2: Reinoculación

MICROORGANISMO	ABSORBANCIA (A) 420 nm
Escherichia coli	0.04
Staphylococcus aureus	0.03
Pseudomona aeruginosa	0.02

TABLA XI. Absorbancia obtenida del inóculo de cada microorganismo bacterial.

MICROORGANISMOS	DILUCIONES						
	-2	-4	-6	-7	-8	-9	-10
	10	10	10	10	10	10	10
E. coli	I	396	15	9	5	3	1
S. aureus	I	843	13	10	4	2	1
Ps. aeruginosa	I	741	30	14	6	3	0

TABLA XII. Cuenta total en UFC/ml de la curva estandar para microorganismos bacteriales.

MICROORGANISMOS	DILUCIONES					
	-2	-3	-4	-5	-6	
	10	10	10	10	10	10
A. niger	a. I	14	2	3	1	
	b. 35	10	9	0	0	

TABLA XIII. Cuenta total de microorganismos de la curva estandar para microorganismos fúngicos.

E. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE RETO DE LA LOCION FACIAL REGENERATIVA.

Se sometieron 2 sistemas preservativos alternativos de acuerdo al tipo de formulación, y una tercera formulación sin sistema preservativo como control de la prueba.

No. DE LOTE DE LA FORMULA	SISTEMA PRESERVATIVO	CONCENTRACION
900839	Dimetiloxazolidina.	2000 ppm
900840	Metil parabeno Imidazolidinil- urea.	0.1 % 0.2 %
900841	Sin sistema preservativo	-

TABLA XIV. Concentración de los sistemas preservativos utilizados en cada formulación.

A continuación se presentan los resultados de la prueba de reto de los sistemas preservativos durante los 5 puntos de ensayo:

SEMANA	MICROORGANISMOS				
	CONTROL	E.coli	S. aureus	Ps.aeruginosa	A.niger
0	0	-	-	-	-
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0

TABLA XV. Cuenta total de microorganismos por gramo de productos en UFC/g recuperados correspondientes al lote 900839.

SEMANA	MICROORGANISMOS				
	CONTROL	E.coli	S. aureus	Ps.aeruginosa	A.niger
0	0	-	-	-	-
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	100	103
4	0	0	0	20	97

TABLA XVI. Cuenta total de microorganismos por gramo de producto en UFC/g recuperados correspondientes al lote 900840.

SEMANA	MICROORGANISMOS				
	CONTROL	E.coli	S. aureus	Ps.aeruginosa	A.niger
0	0	-	-	-	-
1	I	I	I	I	I
2	I	I	I	I	I
3	I	I	I	I	I
4	I	I	I	I	I

TABLA XVII. Cuenta total de microorganismos por gramo de producto en UFC/g recuperados correspondientes al lote 900839.

NOTA: I= Incontable.

VI. ANALISIS DE RESULTADOS

Para resolver el problema de frecuentes contaminaciones microbiológicas, primeramente se evaluaron las posibles causas y una de las más importantes fué que en los productos se cuenta con un pobre sistema preservativo, ya que aún realizando controles microbiológicos estrictos durante todas las etapas de manufactura los productos a granel y terminados se contaminaban. Por lo anterior, era muy importante implementar como prueba de rutina la prueba de reto microbiológico para establecer que sistema preservativo es el más adecuado desde que se está desarrollando la fórmula y así prevenir el que se contamine un producto.

Para realizar la prueba de reto microbiológico, primeramente se obtuvieron los rangos de absorbancia (tomados a 420 nm), en que deben estar los inóculos bacteriales para obtener conteos viables de entre 10^6 y 10^7 UFC/ml y así controlar la concentración inoculada a los productos.

Para Escherichia coli, se observa que a una absorbancia de entre 0.03 y 0.04 se obtienen cuentas totales entre $1 - 100 \times 10^6$ y $1 - 50 \times 10^7$ UFC/ml.

Para Staphylococcus aureus, se observa que a una absorbancia de 0.03 y 0.04 se obtienen cuentas totales entre $1 - 50 \times 10^6$ y $1 - 50 \times 10^7$ UFC/ml para la absorbancia de 0.04 se obtienen cuentas totales entre $1 - 200 \times 10^6$ y $1 - 200 \times 10^7$ UFC/ml.

Para Pseudomona aeruginosa se observa que a una absorbancia de entre 0.01 y 0.02, se obtienen cuentas totales entre $1 - 100 \times 10^6$ y $1 - 100 \times 10^7$ UFC/ml.

Para los 3 microorganismos bacteriales, las concentraciones del inóculo son aceptables de acuerdo a las recomendadas en la literatura, sin embargo los datos obtenidos en la cuenta total de microorganismos viables de las curvas estandar de estos microorganismos están muy dispersos, por lo que se realizaron nuevamente 3 curvas estandar a una absorbancia definida para cada microorganismo controlando las posibles fuentes de error y se observa lo siguiente:

- El comportamiento del crecimiento microbial de las diluciones 1×10^{-2} y 1×10^{-4} no es lineal, por lo que estos puntos se descartaron.

- Los puntos de las diluciones 1×10^{-6} , 1×10^{-8} y 1×10^{-10} se comportan linealmente según las gráficas obtenidas (Figura 1, Figura 2 y Figura 3) y para comprobarlo se calcularon los coeficientes de correlación (r) de cada curva. Los coeficientes de correlación obtenidos están muy cercanos lo que significa que los valores están muy cercanamente relacionados.

Lo anterior justifica que la concentración del inóculo sea entre 1×10^5 y 1×10^7 UFC/ml, ya que éstas concentraciones caen dentro del rango de dilución de entre 1×10^{-4} a 1×10^{-10} donde el comportamiento del crecimiento microbial es lineal y por lo tanto los resultados son confiables.

Finalmente se planeó la prueba de reto microbiológico para realizarla con la loción facial regenerativa que se desarrollo para este fin; se sometieron a la prueba 3 formulaciones cuya única diferencia fué el sistema preservativo. A el lote 900841 no se le adicionó preservativo con la finalidad de que nos sirviera como prueba blanco; en el lote 900839 se utilizó Dimetiloxazolidina como sistema preservativo a una

concentración de 2000 ppm y en el lote 900840 se utilizó Metilparabeno al 0.1% e Imidazolidinilurea 0.2%.

Se realizaron las curvas estándar con el inóculo a la densidad óptica recomendada para controlar la concentración de los microorganismos inoculados.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

En el caso de la formulación que no se le adiciona sistema preservativo, se obtuvo una recuperación de todos los microorganismos y no se cuantificó debido a que se obtuvieron placas incontables (I); por lo que la formulación cumplió su finalidad que fue de ser una formulación blanco para verificar que no hubo interferencia en los resultados obtenidos.

En la formulación donde se adicionó como sistema preservativo Dimetiloxazolidina, se obtuvo un 0.0% de recuperación es decir, es efectivo y es aprobado.

En la formulación donde se adicionó como sistema preservativo Metilparabeno al 0.1% e Imidazolidinilurea al 0.2% se obtuvo más de el 0.1% de recuperación para

Pseudomona aeruginosa y Aspergillus niger, por lo tanto, el sistema preservativo no es efectivo y es rechazado.

VII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de investigación se cumplieron los objetivos propuestos y son los siguientes:

- Se implementó la prueba de reto microbiológico como parte integral en el desarrollo de un producto cosmético en la empresa.
- Se desarrollaron los métodos para realizar la prueba de reto microbiológico en formulaciones miscibles o dispersables en agua.
- Se dio a conocer todos los pasos necesarios para desarrollar un producto cosmético.
- Se implementó la prueba de reto microbiológico con la formulación de la loción facial regenerativa poniendo a reto 2 sistemas preservativos diferentes, y se concluye que el más adecuado es el sistema preservativo de Dimetiloxazolidina a 2000 ppm.

Actualmente se está aplicando la prueba de reto microbiológico en las nuevas formulaciones desarrolladas y en las formulaciones ya existentes con problemas de contaminación, y se están obteniendo resultados muy satisfactorios ya que con la prueba de reto microbiológico y el control estricto en todas las etapas de la manufactura de los productos se han disminuido significativamente las contaminaciones microbiológicas y esto se refleja económicamente en la empresa; además de ofrecer al consumidor un producto de calidad.

VIII. RECOMENDACIONES

- A. Desarrollar el método de reto microbiológico para productos inmiscibles en agua y polvos.

- B. Inocular una mezcla de los microorganismos indicadores, para poner en mayor tensión al sistema.

- C. Validar los métodos de apoyo de la prueba de reto microbiológicos como son: Cuenta total de microorganismos, identificación de microorganismos, y otros.

IX BIBLIOGRAFIA

1. Arndt G.J., "Jojoba". Cosmetics and Toiletries, 102 (6) 68-69, 1987.
2. Castro, C.A.: Principios básicos de formulaciones cosméticas. 1a. Ed., Servicios gráficos/Fac. Farmacua-UCV, Venezuela, 1987. pp 19-72.
3. Delaat N.C., Microbiología 2a Ed., Interamericana, México, D.F., 1990, pp 115-118, 177-179, 271.
4. García H., Pineda J.C., "El Pantenol y los Cosméticos". Perfumeria Moderna, 1989, XX (246), pp 44-48.
5. Harry, Ralph G, cap. 36 Preservatives. 7a. Ed., Editado por Wil Kinson J.B. and Moore R.J., Chemical Publishing, New York, 1975. pp 686-689.
6. Carolina Muñoz, Comunicación Personal, "Manual de Entrenamiento Microbiológico procedimientos de prueba de reto". 1983.

7. Muñoz P.C., Control de Calidad y Preservación de Champús. Licenciatura UNAM, "Facultad de Química", México, D.F., 1977.
8. Orth, A.S., "Consideraciones microbiológicas en el desarrollo y la evaluación de fórmulas cosméticas". Cosmetics and Toiletries, 1989, Tomo III (2), pp 29-39.
9. Ortiz D.M., Gutiérrez I.R. (año 1980) "Estudio de la efectividad de los conservadores en productos cosméticos", Resumen del V Congreso Latinoamericano e Iberico de Químicos Cosméticos, Memorias III.
10. Peña M. J., Importancia de las Lociones Faciales en el cuidado del cutis y en el tratamiento del Acne. Licenciatura UNAM. "Facultad de Química", México D.F., 1988
11. Preservatives Documentary "A Microbiology Primer for the Microbiology Manager". Cosmetics and Toiletries, 1985, pp 73-77.

12. Preservatives Documentary "Compounds that Contribute to Preservative Activity". Cosmetics and Toiletries, 105, pp 61-65.
13. Preservatives Documentary "Cosmetic Preservatives Encyclopedia Antimicrobials". Cosmetics an Toiletries, 105, pp 49-60.
14. Preservatives Documentary "Frequency of Preservative Use in Cosmetic Fórmulas as Pisclosed to FOA-1990. "Cosmetics and Toiletries, 105, pp 45-47.
15. Richter K. "Proteodermin, Sustancia activa para cosméticos". CIR Chemischos Laboratorium Inc.
16. Rotmistrovsky H.E. (1980) "Investigación y desarrollo en Avon su alcance y Ramificaciones", Resumen del V Congreso Latinoamericano e Ibenco de Químicos Cosméticos, Memorias II.
17. Specality Chemicals (1980). "El sistema HLB". ICI Americas Inc.

18. Speciality Chemicals (1980) "Emulsification of cosmetics ingredients". ICI Americas Inc.
19. Ierenbaum, S., Et all., "Collaborativa Study of Procedures for determining the preservative fficacy of water - miscible mascara". The Cosmetic, Toiletri and Fragance Asociación (Microtopicos) pp 61-70, 1986.
20. Tenenbaum, S., Et all., "Laboratory procedures validation and documentary microbiologica. The Cosmetic, Toiletri and Fragance Asociación (Microtopicos), pp 47-60, 1986.
21. William E., Et all., (1980) "Cosmetic Preservation an German11 115", Resumen del V Congreso Latinoamericano e Ibenco de Químicos Cosméticos. Memorias I.
22. Yablonski J.I., Goldman C.L., "The Microbiology of Shampoos". Avon Products, Inc. Suffern, New York, 1980.