



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

“EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE COSMÉTICOS”
TRABAJO ESCRITO VÍA CURSOS DE EDUCACIÓN CONTINUA

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA
EDWIN CRUZ TIOBA**



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



JURADO ASIGANDO

PRESIDENTE: MARÍA DEL SOCORRO ALPÍZAR RAMOS

VOCAL: VERÓNICA ZAMORA SALAZAR

SECRETARIO: EDUARDO JIMÉNEZ LEYVA

1er. SUPLENTE: FRANCISCO GARCÍA OLIVARES

2do. SUPLENTE: JORGE RAFAEL MARTÍNEZ PENICHE

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DE TEMA:

MARÍA DEL SOCORRO ALPÍZAR RAMOS

SUSTENTANTE:

EDWIN CRUZ TIOBA



AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la institución que me ha formado como profesionalista siempre con el compromiso de contribuir y mejorar el entorno nacional con base en el conocimiento, respeto, tolerancia y pluralidad.
 - A la Facultad de Química por ser mi segundo hogar durante mucho tiempo donde tuve la oportunidad de conocer, vivir, sufrir y disfrutar la convivencia con personas en situaciones que formarán parte de mí por siempre.
 - A la Maestra María del Socorro Alpízar Ramos por ser un ejemplo a seguir en la docencia, una excelente persona que impulsa la superación profesional de los alumnos con conocimientos, entusiasmo, confianza, amabilidad y paciencia además por ser guía en el desarrollo de este trabajo.
-



DEDICATORIA

A Dios

Por brindarme la salud, paciencia, tranquilidad y resignación en diferentes momentos de mi vida, estando conmigo en estos difíciles lapsos como en las dichas que han sido decisivos en la culminación de esta etapa en mi vida.

A mi Padre

A la amada memoria de mi padre quien ha sido mi mayor ejemplo de vida, de amor y héroe, sabiendo que no existirá ninguna forma de agradecer una vida de sacrificio y esfuerzo quiero que donde te encuentres te sientas orgulloso de mi. Te amo papá.

A mi Madre

Por haberme dado la vida cobijándome con tu cariño, luchar sin escatimar esfuerzo alguno sacrificando todo para educarme, además de tu apoyo, aliento y amor que desde siempre han estado conmigo en todo instante. Mamá te amo mucho. Mil gracias Mamá.

A mis hermanos.

A Oliver ya que gracias a tu aporte a la familia y sacrificios contribuiste de manera fundamental a que alcance este objetivo. A mi hermana Hortensia por la dicha e ilusión que trajiste contigo a todos en casa, ahora tú también impulsa tus objetivos.

A mi familia

A mi tío Miguel por ser como un padre en todo instante brindándome consejos, apoyo moral y ser una guía los cuales han contribuido al término de mi carrera profesional, sirvan estas líneas como un testimonio de gratitud y eterno reconocimiento de admiración y respeto.

A mi abuelita, tíos y tías, primos y primas, a mis sobrinas por ser una familia maravillosa.

A mis amigos

A cada uno de ustedes Kyoko, Caro, Viri, Ross, Paque, Raquel, Carlo I., L. Armando, Job, Cristian, Luis F., Tolo, Adrián, Saúl, Urzúa, José, Carlos, Iván, Paco, Pastor, Claus, Francisco a todos por compartir distintas experiencias y pasar momentos inolvidables.

A Gaby

*A ti mi Ángel, especialmente a ti mi princesa por cambiar completamente mi vida llenándola de amor, impulsarme en todo momento tú sabes más que nadie lo difícil e importante de este logro, apoyándome más del 100% en toda situación, caminando a mi lado a pesar de toda la adversidad pero sobretodo por ser como eres la persona más maravillosa en mi vida. No existen imposibles si estas a mi lado, simplemente **TE AMO**.*



ÍNDICE GENERAL

<u>I. INTRODUCCIÓN</u>	01
<u>II. ANTECEDENTES</u>	04
2.1 Panorama General Industria Cosmética	04
2.2 Generalidades de los cosméticos	09
2.2.1 Definición	09
2.2.2 Clasificación de cosméticos	10
2.3 Microbiología Cosmética	12
2.3.1 Microorganismos más comunes en formulaciones cosméticas	16
2.3.2 Factores que influyen en el desarrollo de los microorganismos	17
2.3.3 Metabolismo microbiológico	18
2.3.4 Muestreo de cosméticos	19
2.4 Preservación de los cosméticos	21
2.4.1 Generalidades de los conservadores	21
2.4.2 Selección del conservador en productos cosméticos	23
2.4.3 Tipos de conservadores	24
2.5 Buenas Prácticas de Manufactura en cosméticos	25
2.5.1 Límites de microorganismos en cosméticos	33
2.5.2 Identificación de microorganismos	36
<u>III. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA EN COSMÉTICOS</u>	37
3.1 Evaluación Microbiológica de cosméticos en México	38
3.2 Métodos de Conteo Viable	48
3.3 Técnicas actuales en la industria cosmética	56
3.3.1 Diferencia de voltaje	56
3.3.2 Citometría de Flujo	61
<u>IV. GLOSARIO</u>	67
<u>V. DISCUSIÓN</u>	70
<u>VI. CONCLUSIÓN</u>	73
<u>VII. BIBLIOGRAFÍA</u>	74



INTRODUCCIÓN

Los microorganismos se encuentran presentes en todo nuestro entorno contribuyendo en diversos procesos importantes y en una constante interacción con las actividades que desarrollamos, servicios que utilizamos y productos que consumimos de manera benéfica pero de igual forma en algunos de estos deben estar ausentes o en una concentración establecida de tal forma que el tipo de presencia sea inocua en el producto e inofensiva para el consumidor.

La presencia de microorganismos se encuentra latente en productos que a diario la población consume, en espera que estos productos cuenten con la calidad y seguridad para su empleo por parte del consumidor; se debe contar con un control eficiente en su manufactura que asegure la calidad microbiológica de éstos. Los problemas microbiológicos en plantas de manufactura y en los productos terminados están relacionados directamente con la calidad microbiológica de las materias primas, condiciones de fabricación así como los cuidados en el llenado o acondicionado de productos relacionando el manejo de materiales, personal e instalaciones.



Es de vital importancia emplear un control microbiológico que asegure la calidad del producto terminado, que permita evidenciar algún crecimiento microbiano denotando el tipo y número de microorganismos presentes por parte de las empresas dedicadas a la producción de este tipo de productos destinados a la población, en la actualidad la microbiología industrial es una herramienta clave en los procesos de producción ya que denota su importancia al concientizar, controlar e identificar la presencia de microorganismos en los productos finales.

Los cosméticos son uno de los productos de más alto consumo entre las personas y por ende se debe tener en cuenta que estos productos antes de su distribución serán evaluados y estar en conformidad en todos los parámetros de producto como características fisicoquímicas, microbiológicas del producto y físicas del envase que forman parte del producto final.

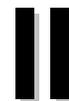
En el rubro de características microbiológicas los cosméticos son productos que si bien no se pretende sean estériles, si aseguren que los conservadores presentes en su formulación mantengan su viabilidad previniendo la presencia de los microorganismos para lo cual es necesario evaluar la calidad microbiológica antes de liberar el producto para su distribución mediante técnicas específicas.

Ante esta necesidad la industria cosmética ha desarrollado metodologías para la evaluación de productos cosméticos apoyada en técnicas de microbiología y evolución de las nuevas tecnologías que tiene como objetivo el buscar, controlar, analizar y asegurar la conformidad microbiológica desde las materias primas requeridas en la formulación, granel antes de acondicionar y el producto final para



ofrecer cosméticos seguros y cumpliendo los lineamientos de regulación establecidos.

Los factores que influyen en la formulación, prevención de desarrollo de microorganismos en una formulación, los controles microbiológicos para su aprobación, los métodos de evaluación microbiológica, los criterios de aceptación y rechazo, límites microbianos con aplicación de nuevas técnicas apoyadas por la ingeniería y sistemas de cómputo serán analizados formando parte del presente trabajo.



ANTECEDENTES

2.1 PANORAMA GENERAL INDUSTRIA COSMÉTICA

Los cosméticos son empleados en todo el mundo, si bien existen áreas como los llamados países occidentales o desarrollados donde este consumo es mayor y su distribución más homogénea, existen otras en las que el uso de los cosmético por condicionantes culturales o religiosos, como en algunos países islámicos es muy bajo, mientras que en los países en desarrollo dependerá directamente del estrato socioeconómico siendo mayor cuanto más alto sea éste. El sector de la cosmética e higiene ha sido capaz de sobrevivir a la revolución industrial logrando evolucionar desde la artesanía a una de las más modernas industrias y ha pasado de ser el privilegio de unos pocos a estar al alcance de todos. En 2004 AC Nielsen llevó a cabo un estudio que se basaba en el análisis de la evolución del valor de las ventas de determinados productos dirigidos al consumidor final en 56 países, de Asia Pacífico, Mercados Emergentes, Europa, Latinoamérica y Norteamérica.



Estos países suponen más del 95% de las ventas mundiales de productos dirigidos al hogar (Productos de Gran Consumo) y más del 75% de la población mundial. Para tener una visión completa de la evolución del mercado de cuidado personal en estos 56 países, ACNielsen incluyó en el estudio cerca de 60 categorías de productos de cuidado personal, que posteriormente fueron agrupados en nueve grandes áreas de productos para la realización de un análisis más exhaustivo: cuidados para bebé, cosméticos, cuidado para el cabello, celulosas, cuidado dental, limpieza e higiene corporal; limpieza e higiene facial, productos para el sol y depilatorios.

El estudio de ACNielsen refleja que los crecimientos en los productos de la categoría de Cuidado Personal en las principales regiones del mundo son muy variables. Latinoamérica, partes de Asia, Europa del Este, Medio Oriente y África experimentan los mayores crecimientos con numerosas categorías creciendo por encima de los dos dígitos, mientras la mayoría de los países más desarrollados reportan evoluciones de menor importancia porcentual.

En los mercados más desarrollados, el crecimiento no es tan significativo. En Norteamérica seis de las nueve áreas de productos de cuidado personal sufrieron descensos del valor total de ventas.

Los tres rubros que más crecieron fueron cuidado dental, cuidado del cabello y limpieza y cremas faciales¹

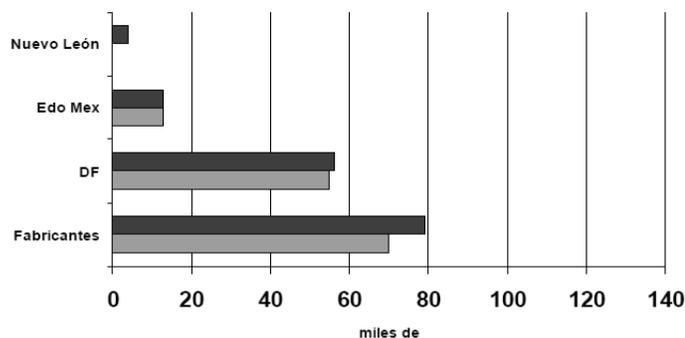


	Número de países	Valor de ventas 2002 US\$ (mio)	Valor de ventas 2003 US\$ (mio)	Crecimiento 2002-2003
Asia Pacífico	16	24.245	24.594	1%
Mercados emergentes	14	5.803	6.582	13%
Europa	17	41.572	43.202	4%
Latinoamérica	7	9.394	10.337	10%
Norteamérica	2	45.224	44.941	-1%
España		4.225	4.620	9.3%

Fuente: De Garcillan López-Rua, Mencía.; Marketing y Cosmética 2ª Ed. Madrid España. 2007. Pág.21

Para este mismo periodo los indicadores específicos para México por parte de CANIPEC y BANCONEXT mostraron la siguiente distribución en el mercado nacional:

Productores cúpula y localización 2004



	Canipec	Total
Fabricantes	70	79
D.F.	55	56
Edo de México	13	13
Nuevo León	0	4
Otros	2	6
Total SIEM	70	79

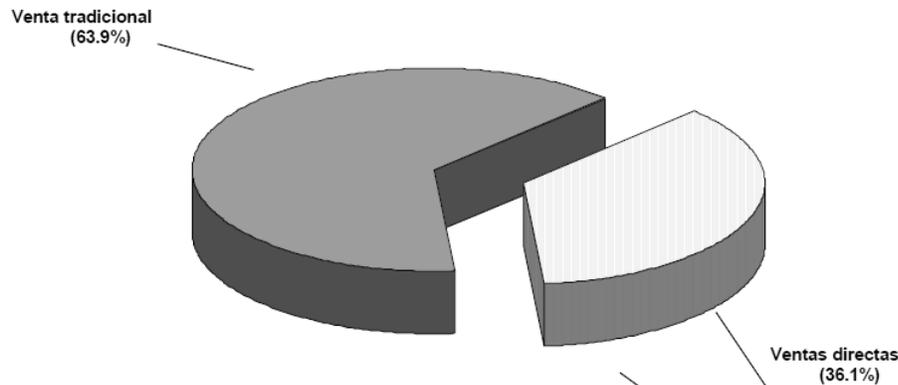
■ Canipec* ■ Total- SIEM
*Cámara Nacional de la Industria de Perfumes y Cosméticos

Fuente: Elaborada por Bancomext con datos del
SIEM – Sistema de Información Mexicano

12



Distribución en ventas del mercado mexicano 2003



El mercado nacional total se calculó en 3,700 millones de Dólares de EU.

Las empresas líderes son: Colgate Palmolive, Gillette, Procter & Gamble, Johnson & Johnson, Beiesdorf, Unilever, L'Oréal y compañías de venta directa como: Avon, House of Fuller y Jafra.

Fuente: Elaborada por Bancomext con datos de Canipec y de Euromonitor

La industria cosmética en México ha sido creciente debido al incremento en el público consumidor; se está reflejando el clímax en la pirámide poblacional; los adolescentes se convierten en adultos con poder adquisitivo.

- En nuestro país se ha dado un incremento en el uso de cosméticos, debido a la actitud de las mujeres mexicanas de considerar a los cosméticos y a los salones de belleza como una oportunidad de consentirse. Los caballeros ya consideran a los cosméticos como elementos indispensables en su arreglo personal.
- Con la recuperación del mercado se da la tendencia hacia el consumo de productos más sofisticados y que respondan a necesidades específicas del consumidor.
- Las nuevas formulaciones y los cambios en las presentaciones contribuyen a incrementar el consumo.



-
- Los productos para el cuidado del cabello han sido líderes en el mercado por varios años. Los productos para bebés ya no son considerados un lujo.
 - Existe capacidad ociosa instalada.

El mercado de cosméticos en México está muy fragmentado y la competencia es fuerte, sobre todo entre empresas multinacionales. En el país se encuentran presentes las principales empresas multinacionales coexistiendo con firmas nacionales. Estas últimas ofrecen principalmente productos orientados al sector popular. La tendencia es hacia mercados masivos, como lo demuestra el incremento en la utilización de cadenas de autoservicios para la venta de cosméticos. Aunado a esta tendencia de mercados masivos, se presenta el decremento de los precios unitarios. Aun cuando la mayoría de los consumidores son fieles a una marca, existe un incremento en el uso de “marcas privadas”, debido a la baja en el poder adquisitivo. Se ha incrementado el uso de ingredientes naturales. Internet no representa actualmente un canal de distribución importante, debido a la falta de confianza que se genera en torno a la forma de pago².

La industria de cosméticos y perfumes cuenta con ventas superiores a \$42 mil millones de pesos en 2008, es generadora de 40 mil empleos directos (150 mil indirectos y un valor de mercado de \$50 mil millones de pesos al año, lo que hace a esta industria en México sólida y estable. La industria de cosméticos mexicana cubre uno de los pocos sectores que pese a que no ha tenido un importante desarrollo tecnológico, ha logrado avanzar en el comercio exterior ya que



mientras en 1999 sus exportaciones ascendían a 190 MDD para 2007 pasaron a 536.6 MDD lo que equivale a un crecimiento anual promedio de 27% de acuerdo a cifras de CANIPEC³.

2.2 GENERALIDADES DE LOS COSMÉTICOS

2.2.1. Definición.

- Cuando se habla de cosméticos nos referimos a las preparaciones o productos destinados para la aplicación externa corporal con el propósito de acondicionar la piel y las distintas partes del cuerpo de ahí que se defina producto cosmético como: toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o bien corregir los olores corporales.⁴
- La Ley General de Salud en el Título XII, capítulo IX, artículo 289 define a los cosméticos como: productos o preparaciones de uso externo destinados a preservar o mejorar la apariencia personal y/o el aseo de las personas.⁵



2.2.2 Clasificación de cosméticos.

- Los productos cosméticos pueden ser clasificados por:
 - Composición del producto.
 - De acuerdo al uso del cosmético.
- De acuerdo al Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios. Productos de perfumería y belleza. Título vigésimo segundo; capítulo I; artículo 187. Los productos de belleza quedan clasificados de la siguiente manera:
 - I. Productos destinados a modificar el olor del cuerpo humano:
 - a. Antitranspirante,
 - b. Desodorante y
 - c. Perfume;
 - II. Productos o preparaciones de uso externo, destinados a preservar, mejorar o modificar la apariencia personal:
 - 1. Para el cabello:
 - d. Acondicionador,
 - e. Alaciador,
 - f. Decolorante,
 - g. Enjuague,
 - h. Fijador,
 - i. Producto para permanente,
 - j. Tinte y
 - k. Tratamiento capilar;



2. Para uso facial o corporal:

- a. Aceite,
- b. Autobronceador,
- c. Bloqueador solar,
- d. Bronceador,
- e. Crema,
- f. Corrector,
- g. Depilatorio,
- h. Desmaquillante,
- i. Epilatorio,
- j. Gel,
- k. Loción,
- l. Maquillaje,
- m. Maquillaje para ojos,
- n. Mascarilla,
- o. Producto para labios,
- p. Protector o filtro solar y
- q. Rubor y

3. Para manos y uñas:

- a. Para el cuidado de las uñas,
- b. Para la limpieza de las manos,
- c. Removedor de cutícula y
- d. Removedor o quita esmalte;



III. Productos o preparados destinados al aseo de las personas:

- a. Champú (Shampoo),
- b. Dermolimpiador,
- c. Jabón de tocador,
- d. Para el baño: sales y burbujas,
- e. Preparaciones para antes y después del afeitado y
- f. Toallitas limpiadoras, y

IV. Otros productos:

Adhesivos para pestañas y uñas postizas.

2.3 MICROBIOLOGÍA COSMÉTICA

La contaminación microbiana de los productos cosméticos es una cuestión de gran importancia para la industria y puede convertirse en una causa importante de pérdidas económicas, así como en un riesgo para los consumidores.

El consumo que tienen hoy en día los productos cosméticos hace elemental el contemplar un alto estándar de calidad microbiológico antes, durante y después de su fabricación, por tal motivo es de gran importancia el mencionar los factores que afectan el deterioro de las formulaciones, los métodos de control microbiológico, los principios de prevención y los de conservación.

La contaminación microbiana de un producto cosmético puede tener diferente origen: materias primas, medio ambiente, equipo de fabricación, envasado, personal y empleo por el consumidor. 20



- Contenido microbiano en Materias primas

Con la finalidad de reducir el riesgo de un producto final contaminado es necesario controlar el contenido microbiano de las materias primas de un cosmético conjuntamente con los parámetros físicos y/o químicos.⁶

Cuando se establecen niveles aceptables de contenido microbiano en materias primas, deben de considerarse los siguientes criterios:

- Composición química
- Naturaleza física
- Origen y viabilidad
- Uniformidad del lote
- Proceso de manufactura
- Concentración de materia prima utilizada en el producto
- Historial de controles de la materia prima
- Condiciones de almacenaje
- Coeficiente de actividad de agua

El grado de contaminación de las materias primas depende del origen; así aquellas que son de origen sintético contienen relativamente pocos microorganismos, debido a sus valores extremos de pH, su bajo contenido de agua y a sus inherentes propiedades antimicrobianas, mientras que las sustancias naturales presentan mayor riesgo de contaminación (gomas, extractos vegetales). El agua utilizada en la fabricación del producto es posiblemente el origen más frecuente de contaminación.⁷



- Medio ambiente

El aire contiene principalmente microorganismos mesófilos, hongos y esporas bacterianas que pueden entrar en contacto con el producto cuando no existe un adecuado manejo de áreas. Para evitarlo, se deben reducir al máximo las corrientes de aire sobre el producto cosmético durante su acondicionado, flujo de los materiales y zonas de almacenaje de materiales o producto terminado.

- Equipo de fabricación y envasado

El producto se puede contaminar fácilmente por microorganismos que se acumulan como consecuencia de una limpieza deficiente o inadecuada de los equipos e instalaciones.

- Personal

Muchos de los procesos realizados durante la fabricación y envasado requieren la intervención de operadores que por consecuencia puede ser un riesgo microbiológico importante y en ocasiones difícilmente controlable. Los operarios deben ser debidamente formados en hábitos de higiene personal, así como en el seguimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación. Los cosméticos pueden contaminarse con microorganismos residentes en la piel del propio personal responsable de estas etapas. Para evitar la contaminación microbiológica de los cosméticos, el fabricante deberá controlar cada una de las posibles vías de entrada mediante análisis microbiológico de materias primas, ambiente y equipos, a la vez que se sigue un plan de aplicación de Buenas Prácticas de Fabricación. Sin embargo, aún en estas correctas condiciones de fabricación y manipulación



siempre existe el riesgo de que algún microorganismo se incorpore al producto modificando las características iniciales de aspecto, color, olor o fisicoquímicas; esto favorecido por el contenido de agua, pH e ingredientes presentes en la formulación que sirven como nutrientes necesarios en el desarrollo del microorganismo.

- Empleo por el consumidor

Una vez que el producto sea utilizado por el consumidor, es posible que éste no haga uso adecuado del mismo (envase destapado, adición de agua, uso en deficientes condiciones higiénicas) y también cabe la posibilidad de no ser almacenado de manera apropiada (elevadas temperaturas y humedad).

Lo cual puede provocar que el cosmético sufra una degradación, viéndose comprometida su calidad y la seguridad de uso.

Para poder proteger al producto cosmético de la degradación como consecuencia de una contaminación microbiológica, se incorporan a las fórmulas cosméticas ingredientes específicos denominados conservadores que serán revisados más adelante.



2.3.1 Microorganismos más frecuentes en formulaciones cosméticas.

Desde siempre el reto para la industria cosmética es preservar la inocuidad de sus productos, debido a la habilidad de los microorganismos para reproducirse en los cosméticos y por tanto a la contaminación microbiológica de los mismos^{3, 8 y 9}, ya que como se ha mencionado con anterioridad estos productos constituyen, por su composición, un buen sustrato para que los microorganismos puedan desarrollarse y frecuentemente son la causa del efecto negativo sobre alguna de sus características, funcionalidad o estética del producto (como alteraciones organolépticas, olores ofensivos, cambios en la viscosidad y/o el color) y como resultado provocará el rechazo del consumidor.

A continuación se mencionan los microorganismos comúnmente aislados de productos cosméticos: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium*, especies de *Bacillus*, así como *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*. Las bacterias Gram negativas son las más comunes debido a que tienen diversas capacidades metabólicas y pueden sobrevivir a ambientes con condiciones extremas. Estas bacterias comúnmente tienen interacción con el producto a través de suministros del agua.¹⁰

Sin embargo hongos como: *Penicillium* y levaduras como: *Candida albicans*, también pueden estar presentes en los productos y ser la causa de problemas de contaminación en productos terminados¹¹.

Algunos microorganismos comunes por contaminación ambiental como los denominados mesófilos aerobios pueden estar presentes siempre y cuando se



encuentren dentro de los límites establecidos de concentración para no afectar las características del producto.

2.3.2 Factores que influyen en el desarrollo de los microorganismos.

Los microorganismos son capaces de utilizar procesos metabólicos para la utilización de las más diversas fuentes de alimento. No existe la posibilidad de que un solo compuesto orgánico pueda proporcionar todo lo necesario para el desarrollo de un microorganismo, pero si se puede afirmar que existen bacterias que pueden usar compuestos muy simples como substratos.

Una de las características importantes de los microorganismos es la utilización de varias fuentes de carbono. Todos los microorganismos requieren de una fuente de energía ya sea radiante o química, cada caso derivado de la oxidación de varios compuestos. Todos los microorganismos necesitan un gran número de elementos necesarios para su funcionamiento, los cuales deben estar presentes en su protoplasma como el fósforo, azufre, hierro, cobre, magnesio, selenio, cobalto y otros elementos además de una fuente de carbono y nitrógeno.

Gran variedad de microorganismos requieren bióxido de carbono para su desarrollo, aquellos que pueden utilizar carbono para su metabolismo a partir solamente del bióxido de carbono son llamados autotróficos. Las bacterias de esta clasificación incluyen a las fotosintéticas que oxidan amonio, nitrito, sulfuro de hidrógeno, tiosulfato, metano y sales ferrosas. La mayoría de los microorganismos son aerobios por lo que pueden estar presentes en los cosméticos.



Algunas especies requieren fuentes orgánicas de nitrógeno, de sulfuro o ambos; un solo alimento puede suministrar completamente todo lo necesario.

Los siguientes compuestos presentes en cosméticos pueden servir como substrato para microorganismos¹²:

- Carbohidratos, glucósidos: gomas naturales, mucílagos, pectinas, almidones, dextrinas y azúcares.
- Alcoholes; glicerol, manitol y sorbitol.
- Ácidos grasos y sus ésteres; grasas animales y vegetales, aceites y mezclas.
- Esteroides, colesterol.
- Proteínas; peptonas y aminoácidos.
- Vitaminas.

2.3.3. Metabolismo Microbiológico.

Al crecer los hongos y las bacterias pueden ocasionar cambios rápidos y profundos en su medio inmediato y, en la síntesis de nuevo protoplasma; se realizan muchas reacciones químicas complejas dentro de un lapso corto, estas reacciones las realizan los microorganismos a través de enzimas, algunas reacciones básicas que se pueden producir son de hidrólisis, deshidratación, oxidación – reducción, descarboxilación, desaminación, fosforilación o desfosforilación.

La velocidad con que los microorganismos pueden propagarse, y la variedad de reacciones que pueden efectuar, indican hasta qué punto es necesario inhibir su



crecimiento en productos cuyas características físicas deben mantenerse inalterados durante largos periodos de almacenamiento y de uso en manos del consumidor.

Los factores que determinan el deterioro microbiano se dividen de la siguiente forma:

Factores intrínsecos	Factores extrínsecos	Factores inherentes al proceso de fabricación
<ul style="list-style-type: none">- Disponibilidad de agua (a_w)- Potencial de óxido-reducción- Contenido de nutrientes- pH- Presión Osmótica	<ul style="list-style-type: none">- Tamaño del inóculo- Temperatura de almacenamiento- Vida útil del producto	<ul style="list-style-type: none">- Interacciones que se establecen entre los microorganismos presentes dentro de la formulación

2.3.4 - Muestreo de cosméticos.

Los productos cosméticos deben conservar sus características microbiológicas, conforme los requisitos especificados. El cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación, los sistemas de envasado y conservadores utilizados en la formulación pueden garantizar estas características¹³. El muestreo durante la producción industrial de un lote en la etapa de acondicionado para un cosmético debe asegurar la trazabilidad y verificación de la conformidad de la totalidad de las piezas envasadas desde el inicio hasta el final del día o periodo que establezca la empresa de acuerdo a criterios de tiempos, riesgos o actividades implicadas en el proceso de acondicionamiento de la fórmula o producto.



Como parte del desarrollo del producto esta conformidad microbiológica debe realizarse desde los pasos de formulación y pruebas de estabilidad, las características microbiológicas en estudio evalúan el sistema conservante del producto por medio de la prueba de desafío efectuada antes y/o después del período de un estudio acelerado con el empleo del embalaje en el cual se contendrá el producto¹⁰ denominado envase primario¹⁴ o artículo de acondicionamiento (AC).

El correcto muestreo dentro de la producción de cosméticos debe realizarse a través de muestreos regulares según los procedimientos escritos o establecidos por la empresa fabricante considerando sus variantes de personal, instalaciones y horarios de trabajo en los que se ha de especificar la persona o personas capacitadas para tomar muestras, las cantidades que se han de tomar, los materiales que se han de utilizar y las precauciones específicas que se hayan de tomar.

Cada muestra depositada en el laboratorio de control ha de estar claramente identificada mediante una etiqueta que contenga los datos necesarios para su rastreabilidad como:

- El nombre del producto.- donde pueden incluirse datos de fabricación.
- El número de lote.- sí la nomenclatura es de carácter interno tendrá que asegurarse su trazabilidad.
- La fecha de toma de la muestra,
- Las iniciales de la persona que ha efectuado el muestreo.



Se han de almacenar muestras de cada lote en un local apropiado (muestroteca), cuyo acceso ha de estar limitado a las personas autorizadas para el recontrol o verificación posterior del producto de referencia y fecha específica. La magnitud de la muestra ha de ser suficiente para que puedan efectuarse dos análisis completos de cualquiera de sus análisis.

El registro de los análisis efectuados se ha de conservar según las necesidades de la empresa. A título indicativo, la duración de la conservación de estos registros no debería ser inferior a un año en cuanto a las materias primas y a los materiales de acondicionamiento. Para los muestreos de producto terminado, esta duración no debería ser inferior a la vida mediana del producto establecida por la empresa¹⁵.

2.4 PRESERVACIÓN DE LOS COSMÉTICOS

2.4.1 Generalidades de los Conservadores.

Un conservador es una sustancia antimicrobiana que se añade a un producto en cantidades muy pequeñas (entre 0.0007 % y 1 % del principio activo, dependiendo del producto) durante el proceso de fabricación y es capaz de oponerse a las alteraciones de origen químico o microbiológico de un producto¹⁶.

Debido a que muchos de los productos actuales para el cuidado personal son a base de agua, éstos presentan un medio ideal para el desarrollo de microorganismos, por lo cual el conservador ideal debería reunir las siguientes características: tener un amplio espectro de actividad antimicrobiana, que no



produzca ninguna reacción de sensibilización, que tenga una estructura química conocida, que sea completamente soluble en agua, que permanezca estable en condiciones extremas de pH y temperatura, que sea compatible con todos los ingredientes de la formulación y envasado, que no altere los caracteres organolépticos del cosmético al cual se ha incorporado y, por último, que sea barato^{17 y 18}.

Ningún agente conservador solo puede posiblemente satisfacer todos estos criterios, consecuentemente para crear un sistema conservador adecuado que aporte protección durante las fases de elaboración del cosmético y que ésta se prolongue durante toda la vida del cosmético en manos del usuario, será necesario en la mayoría de las ocasiones la combinación de más de un conservador. La elección la debe realizar el microbiólogo cosmético, quien basándose en la experiencia de formulaciones anteriores y considerando la naturaleza química de los ingredientes, método de fabricación, propiedades fisicoquímicas del producto, tipo de envase, condiciones de aplicación y coste, escogerá el conservador o sistema conservador más adecuado para cada producto. La elección del sistema conservador más adecuado siempre debe ser un compromiso entre la eficacia, estabilidad y seguridad¹⁹.

Los conservadores generalmente consisten de dos o más moléculas con diferentes modos de acción contra los microorganismos, las dos funciones principales son: inhibir el deterioro por los organismos y el otro es el prevenir el crecimiento de organismos potencialmente patógenos⁷. El desafío es extender la



acción biocida para todo tipo de microorganismos, evitando la promoción de la resistencia microbiana.

2.4.2 Selección del conservador en productos cosméticos.

Los conservadores son usados comúnmente para controlar la contaminación del producto²⁰ y en la búsqueda de un sistema de conservación eficaz, es necesario tener en cuenta no sólo su eficacia contra los microorganismos, sino también la compatibilidad de los conservadores con otras materias primas de las fórmulas que en ocasiones son complejas para cosméticos, su antagonismo o sinergia con otros ingredientes, el proceso de fabricación del producto¹⁶.

Como los antibióticos, los preservativos pueden seleccionar para las cepas resistentes. Por lo tanto, no es inconcebible que estas cepas puedan ser sometidas a una resistencia cruzada a los agentes antimicrobianos utilizados para el tratamiento de los seres humanos. Este escenario es poco probable que se originan en el hogar del consumidor, porque las concentraciones de conservadores en los productos suelen ser lo suficientemente alta como para prevenir la aparición de cepas adaptadas.

Sin embargo, la resistencia podría desarrollar en las plantas de fabricación con un bajo nivel de higiene o si el control microbiológico de las materias primas (especialmente el agua) no es adecuada.



El crecimiento de las biopelículas microbianas resistentes a los distintos conservadores y desinfectantes se ve favorecida por la dilución de los productos cosméticos en las diferentes áreas de la planta de producción. Resultado de las biopelículas en las contaminaciones intermitentes y erráticas por bacterias resistentes a los conservadores de uso común en productos cosméticos. La incorporación de mayores concentraciones de conservadores para productos (siempre de acuerdo con los reglamentos) a fin de evitar este tipo de contaminación, podría resolver el problema en algunos casos, pero este método no es práctico ya que puede generar toxicidad para el consumidor ^{16, 21, 22}.

2.4.3 Tipos de conservadores.

Se distinguen dos tipos de conservadores:

- Los conservadores antisépticos, que impiden la proliferación de microorganismos. Las contaminaciones pueden ser de origen bacteriano o fúngico.
- Los antioxidantes, que evitan las alteraciones de origen químico debidas al oxígeno del aire.

En el cuadro anexo abajo pueden observarse los agentes antimicrobianos más utilizados actualmente en las formulaciones cosméticas como conservadores. De todos ellos, los parabenos son los conservadores más utilizados, mayoritariamente combinados con fenoxietanol y donadores de formaldehído⁷.



Los conservadores químicos tradicionales actuales incluyen:

Conservadores químicos tradicionales	
Familias	Conservantes
Ácidos	<ul style="list-style-type: none">- Ácido benzoico y sus sales- Ácido dehidroacético y sus sales- Ácido p-hidroxibenzoico (sus sales y ésteres) (parabenos)- Ácido sórbico y sus sales
Alcoholes	<ul style="list-style-type: none">- Alcohol bencílico- Alcohol 2,4-diclorobencílico
Derivados fenólicos	<ul style="list-style-type: none">- Fenoxietanol- Triclosán
Donadores formaldehído	<ul style="list-style-type: none">- Bromonitrodioxano- Bromonitropropanodiol- Diazolidinil urea- Imidazolidinil urea- Quaternium-15- DMDM hidantoína
Otros	<ul style="list-style-type: none">- Yodopropinilbutilcarbamato- Clorometilisotiazolinona + metilisotiazolinona- Metildibromogluaronitrilo

Fuente: Leranoz S. 2002. "Dermofarmacia. Conservantes en Cosméticos" 21:7. Pág. 75

2.5 BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA EN COSMÉTICOS.

Se trata de la manufactura de productos cosméticos organizando y llevando a cabo la producción de los mismos en forma segura de manera que los factores humanos, técnicos y administrativos, que influyen sobre la calidad de los productos, estén efectivamente bajo control. Los problemas deben ser reducidos, eliminados y lo más importante anticipados, con énfasis en el concepto de Calidad Total²³.



Para que un producto cosmético cuente con la calidad microbiología se deben adecuar instalaciones y servicios teniendo en cuenta todos los factores que puedan intervenir en el flujo de manufactura desde su inicio con materias primas pasando por las aéreas de fabricación, acondicionamiento llegando a su presentación final que el consumidor podrá tener en sus manos. Un producto de calidad es el que satisface las necesidades del consumidor y cumple la normativa legal vigente para asegurar que los productos que se comercializan en el mercado son productos, todas las empresas han de crear, poner en práctica y mantener un sistema de calidad capaz de asegurar dichas características.

Los requisitos que en nuestro país son necesarios cumplir para la industria del sector en los lineamientos de buenas prácticas en rubros de organización del establecimiento, personal, equipos de control y documentación son la Norma Oficial: NOM-059-SSA1-2006, NOM-089-SSA1-1994 y NOM-141-SSA1-1995.

Cabe señalar que la industria cosmética actualmente no cuenta con una norma dedicada a establecer los requerimientos básicos para la manufactura de los productos cosméticos a diferencia de los medicamentos o alimentos pero en el ámbito internacional en 1995 el Consejo de Europa publicó el documento titulado *“Lignes directrices de bonnes pratiques de production des produits cosmétiques (BPPC)*, texto en el que se proponen varias recomendaciones sobre la organización y las prácticas que permiten la gestión de los factores humanos, técnicos y administrativos que tienen una incidencia sobre la calidad de los productos cosméticos.



Estas recomendaciones, destinadas a guiar a las empresas fabricantes de productos cosméticos, proponen la manera de poner en práctica un sistema de calidad eficaz en estas empresas enfocado a eliminar y prevenir deficiencias en materia de calidad en la producción de productos cosméticos.

Las Buenas prácticas de manufactura serán una constante para que el personal se sitúe dentro de la estructura organizativa conociendo las responsabilidades y tareas que le sean encomendados para disponer de las instrucciones, informaciones y datos relativos a la etapa de la producción que le corresponda, estar motivado permanentemente para señalar cualquier anomalía y evidencia de no conformidad dentro de cada etapa de la producción con lo más importante en fabricación: adaptarse a ciertas prácticas en materia de higiene individual y a las instrucciones referentes a la forma de trabajar y de llevar a cabo las operaciones con la adecuada formación para las actividades algunos de los lineamientos de las BPPC que se pueden mencionar son las siguientes:

Instalaciones.

Las instalaciones se han de diseñar, construir y acondicionar con el objetivo de satisfacer las condiciones que impongan las actividades que estén destinadas a realizarse en ellos, la elección del material de construcción, así como la distribución de las áreas en el momento de su diseño son factores determinantes para mantener: el orden, la limpieza y/o desinfección las condiciones de temperatura convenientes, las condiciones de higiene adecuadas para así evitar el riesgo de agua estancada las partículas de polvo en la atmósfera, la presencia de



insectos y otros animales, la acumulación de suciedad además los establecimientos se han de adecuar al volumen de materiales de producción y distribuirlos de forma que se minimice en lo posible el cruzamiento de materiales y distintos productos (producto semiterminado, producto terminado, materiales aprobados, en cuarentena o rechazados) y de personal (paso de personal no relacionado con la actividad). Todas las instalaciones han de conservarse limpias y adecuadas. La efectividad de los procesos de limpieza y desinfección deberían comprobarse periódicamente. Las superficies (paredes, suelos, superficies de trabajo) han de ser lisas y de materiales no porosos para facilitar la limpieza. Se han de evitar los ángulos rectos en las uniones entre paredes y suelos para evitar la acumulación de polvo y suciedad, sustituyéndolos por redondeadas. También se contará un sistema de drenaje o eliminación de agua que se pueda generar durante el proceso de producción o en la limpieza de los equipos para evitar el estancamiento, que puede favorecer la proliferación de microorganismos.

No debe existir el contacto directo de las zonas de fabricación con el exterior para evitar la entrada de polvo. En las zonas de producción donde se genere polvo se debería disponer de sistemas de extracción adecuados al igual que en las zonas de fabricación con el exterior para evitar la entrada de insectos y otros animales. En las entradas de las instalaciones y de las zonas de producción debería instalarse aparatos atrapa insectos y trampas para roedores, entre otras posibles medidas para evitar el acceso de animales.



Las buenas condiciones de iluminación natural y/o artificial, un número suficiente de lavabos, equipos de agua caliente y fría, herramientas necesarias para lavarse las manos y secárselas en buenas condiciones higiénicas serán demandantes y cruciales en el mantenimiento de las condiciones de higiene.

Equipos y materiales

Los equipos o el material de producción debe diseñarse, instalarse y mantenerse según su finalidad donde éste no presente ningún riesgo o contribuya a la degradación del producto, también los instrumentos de medición utilizados para la fabricación y el control han de ser apropiados, precisos y fiables. Antes de cualquier operación de producción, los equipos han de ser inspeccionados con la finalidad de asegurar el buen estado del material. Han de limpiarse y enjuagarse de forma apropiada con la finalidad de evitar cualquier contaminación del producto. La empresa debe contar con instrucciones de utilización y registros de actividades de mantenimiento de los equipos de producción. Existirán instrucciones de limpieza y desinfección, si fuera preciso.

Todos los equipos han de estar identificados con relación a su estado de limpieza y/o disponibilidad para ser utilizados, así como el tiempo de validez de este estado. Es útil disponer de un registro con el histórico de todos los procesos realizados en los equipos. El equipo y la maquinaria se instalarán de forma que el movimiento de los materiales, maquinaria y personal no constituya un riesgo para la calidad del producto y de acuerdo con el flujo lógico de producción y evite el cruce de procesos y pasos atrás.



Estos instrumentos contarán con una calibración periódica para confirmar la exactitud de lecturas y registros al igual que las operaciones de limpieza han de quedar registradas y estos registros han de conservarse.

Procedimientos y procesos

Los procedimientos y procesos deben ser administrados con carácter riguroso y mantenidos de forma que en cualquier momento se puedan recuperar los documentos necesarios: instrucciones, procedimientos, procesos, estructura organizativa, documentos relativos al personal.

Procedimientos e instrucciones serán creados, escritos y establecidos en cada empresa adaptando la naturaleza de sus producciones y su estructura describiendo las operaciones a efectuar, las precauciones que han de tomarse y las medidas que han de aplicarse a los diferentes campos relacionados con la producción. Una buena documentación es una parte fundamental del sistema de calidad la cual estará disponible para el personal de la empresa.

Para evitar defectos de comunicación (errores de transmisión, memoria, etc.) es necesario que las actividades previstas consten por escrito y las que se han llevado a cabo queden documentadas.

Cada compañía ha de tener un sistema de documentación que garantice la existencia de los documentos necesarios (instrucciones, procedimientos, procesos, organización de la estructura, formación, etc.), así como el procedimiento para su gestión.



Los procedimientos han de establecerse especialmente a:

- muestreo de materias primas,
- material de acondicionamiento,
- verificación de los procedimientos de fabricación,
- métodos de acondicionamiento,
- métodos de control,
- materias primas
- instalaciones,
- calibración de los instrumentos de medición en la fabricación y las líneas de acondicionamiento,
- limpieza y/o desinfección de los locales y materiales utilizados en la producción,
- acciones a tener en cuenta antes de iniciar cualquier operación de producción, por ejemplo, el vaciado de la línea, retirada de los productos del mercado, disposiciones y pasos a tomar dentro del marco de conformidad de los materiales de acondicionamiento, materias primas, productos semiterminados y producto terminado.

Para cada producto o grupo de productos, las instrucciones han de describir de forma detallada las operaciones relativas a la fabricación y acondicionamiento, los medios utilizados y los métodos aplicados¹².

Las empresas deben renovarse de acuerdo a los adelantos que se presenten ya sea con desarrollos tecnológicos ligados a maquinarias, materiales de empaque o equipos de control progresos en sus procesos de manufactura, técnicas de acondicionamiento y evoluciones en la organización de la producción.



La presencia de microorganismos en los productos cosméticos es un factor determinante en la calidad por tal motivo la industria cosmética establece controles para asegurar la puesta a disposición de los productos en el mercado sin riesgo de presencia dañina de microorganismos al consumidor.

La mayoría de las formulaciones cosméticas, debido a que contienen un elevado porcentaje de agua y a que muchas de las sustancias utilizadas en su fabricación pueden ser degradadas biológicamente por microorganismos, son productos que se deterioran con el paso del tiempo por la exposición a las condiciones del medio donde se encuentran durante el periodo de uso por parte del consumidor.

La presencia de microorganismos en los productos cosméticos puede producir cambios en el aspecto físico, color, olor y textura. En estas ocasiones, cuando el consumidor detecta signos visibles de alteración, reacciona rechazando el producto. Sin embargo, cuando la contaminación microbiológica no modifica el aspecto del cosmético representa un importante riesgo para la salud del consumidor, ya que en estas condiciones los cosméticos pueden causar irritaciones o infecciones, particularmente si el producto se aplica sobre piel dañada, ojos o en niños. La microbiología cosmética es una parte de la microbiología especializada en la evaluación de la calidad microbiológica de los productos cosméticos, estudio de los factores que afectan el deterioro de las formulaciones, los métodos de control Microbiológico y los principios de prevención y conservación.²⁴



2.5.1 Límites de microorganismos en cosméticos.

A pesar de que cuando un producto cosmético sale al mercado se realizan todos los estudios necesarios que verifican que el producto es seguro desde un punto de vista microbiológico, desde la recepción de las materias primas hasta que el producto está listo para ponerse en el punto de venta pueden producirse errores que ponen de manifiesto la necesidad de controlar microbiológicamente todas las fabricaciones que salen al mercado.

Desde un punto de vista legislativo, no existe ninguna norma de obligado cumplimiento que regule los límites de contenido microbiológico de los productos cosméticos a nivel mundial. Sin embargo, asociaciones como el Comité Asesor de Cosmetología en España o la CTFA (*Cosmetics, Toiletry & Fragrance Association*) han publicado las siguientes directrices a cumplir por los productos cosméticos²⁰:

TIPO DE COSMÉTICO

LIMITES DE ACEPTACIÓN

Cosmético de uso
Infantil o
en el contorno de ojos

- a) Recuento de microorganismos mesófilos aerobios /
viales totales:
10² UFC/g o ml.
- Ausencia de microorganismos patógenos en 1g o ml.
- b) *Pseudomonas aeruginosa*.
- c) *Staphylococcus aureus*
- d) *C. albicans*
- e) *A. niger*.
- f) Coliformes totales y fecales.

Cosmético de uso
General

- a) Recuento de microorganismos mesófilos aerobios /
viables totales:
10³ UFC / g o ml.
- Ausencia de microorganismos patógenos en 1g o ml.
- b) *Pseudomonas aeruginosa*.
- c) *Staphylococcus aureus*
- d) *C. albicans*
- e) *A. niger*.
- f) Coliformes totales y fecales.



En el campo legislativo de nuestro país en lo que respecta a productos cosméticos se describen primeramente en la Ley General de Salud que el control sanitario será aplicable a el proceso, uso, mantenimiento, importación, exportación, y disposición final de productos higiénicos considerados como insumos para la salud además de contar con una autorización sanitaria expedida por la Secretaría de Salud para la importación de este tipo de productos². Así mismo los proveedores están obligados a informar de inmediato a las autoridades si determinan que alguno de sus productos puede implicar riesgos para la vida o la salud de los consumidores²⁵.

El Reglamento de Control Sanitario de Productos y servicios aporta que es necesaria una regulación, control y fomento sanitario del proceso, importación y exportación, así como de las actividades, servicios y establecimientos de los productos de perfumería, belleza y aseo²⁶, los fabricantes de productos de perfumería y belleza son responsables de la calidad sanitaria de los productos que elaboran²⁷ entendiéndose como productos de perfumería, belleza y aseo a los destinados para su aplicación directamente a la piel y sus anexos cuya finalidad es la de embellecer, mejorar la apariencia y conservar la limpieza y pulcritud de las personas al igual que los productos de perfumería y belleza para el cabello como: acondicionador, alaciador, shampoo, enjuague, gel, tratamiento o loción capilar.

El Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios define y estipula los límites microbianos que un cosmético fabricado o distribuido en el territorio nacional debe cumplir:



Los límites microbiológicos para los productos de perfumería y belleza, no deberán exceder los siguientes²⁵:

1.- Microorganismos aerobios:

- a. No más de 500 UFC/g o ml en los productos para niños y para aplicación en el área de los ojos, y
- b. No más de 1 000 UFC/g o ml para los demás productos,

2.- Mohos y levaduras no más de 100 UFC/g o ml,

3.- *Escherichia coli* negativa/g o ml,

4.- *Salmonella* spp negativa en 25 g o ml,

5.- *Pseudomonas* spp negativa/g o ml y

6.- *Staphylococcus aureus* negativo/g o ml.

Las disposiciones sanitarias de los productos cosméticos en México son descritas en la NOM-089-SSA1-1994, “*Bienes y Servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza*” pero los fabricantes podrán efectuar métodos diferentes a los incluidos en esta norma, para el control interno de sus productos; pero para efectos de comprobación de resultados por acciones de verificación sanitaria, se deben ajustar a los métodos de ésta Norma²¹.



2.5.2 Identificación de Microorganismos.

En la actualidad la identificación de microorganismos se adecua a las actividades y tipo de producto que cada empresa produzca así que para la aplicación de técnicas y cumplimiento con el marco legislativo de la evaluación de productos cosméticos en el país se referencia a los métodos empleados en la NOM-089-SSA1-1994 pero cada empresa puede incluir su procedimiento interno que incluya la metodología necesaria para asegurar la calidad microbiológica.

Sin embargo la identificación de una presencia microbiana en un producto cosmético incluye técnicas establecidas como:

Cuenta total de hongos, levaduras y mesófilos aerobios

Identificación de patógenos

Tinción de Gram

Identificación de *S. aureus*

Identificación de *Pseudomona sp.*

Identificación de *Salmonella sp.*

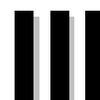
Pruebas selectivas para *Escherichia coli.*

Pruebas bioquímicas API

Que aplican en marco legislativo nacional necesario en la industria cosmética. La identificación de estos microorganismos en productos cosméticos está directamente relacionada con los límites establecidos vinculados con la calidad que un producto cosmético se debe contar para poder estar al alcance del consumidor.



-
- 1 De Garcillan López-Rua, Mencia; Marketing y Cosmética 2ª Ed. Madrid España. 2007. Capítulo1.
 - 2 Bernárdez, Zapata Telma. CANIPEC: La Industria Cosmética en México Oportunidades en los Mercados Externos. Bancomext. Junio 2005.
 - 3 Cámara nacional de la industria de perfumería y cosmética. CANIPEC. Memoria estadística (2008).
 4. Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (CE) No.1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre los productos cosméticos. Capítulo 1, artículo 2, L 342/6; 30 de Noviembre de 2009.
 - 5 Ley General de Salud: última Reforma, DOF 20-08-2009.
 - 6 Jasnow, S.B. and Smith, J.L. 1975. Microwave sanitization of color additives used in cosmetics feasibility. *Applied Microbiology*, 205-211.
 - 7 "Handling, Storage and Analysis of Raw Materials," CTFA Quality Assurance Guidelines, The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Washington, D.C. 20036; December 1992.
 8. Nasser, L.A. 2008. Fungal Profiles Isolated from Open and Used Cosmetic Products Collected from Different Localities in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 15 (1) 121-128.
 - 9 Fujita, Y., H. Shibayama, Y. Suzuki, S. Karita, and S. Takamatsu. 2005. Rapid and accurate identification of microorganisms containing homology. *International Journal of Cosmetic Science*, 27: 6.
 - 10 Perry, B. 2001, *Cosmetic microbiology*, *Microbiology Today*, 28: 185-187.
 - 11 Berdick, M. 1973. The regulation of color additives in the United States. *CTFA Cosmet. J.* 5:27.
 - 12 Balsam, Ms., and Barnett, G. 1972. *Cosmetic Science and Technology*, 7 ed., Interscience Publisher, pp. 1034-1052.
 - 13 Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos / Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. I. Series Temáticas II. Cosméticos. 1ª ed. Brasilia: ANVISA, 2004. 52p (Serie Calidad en Cosméticos; v. 1) págs. 14, 17-18.
 - 14 Norma Oficial Mexicana NOM-141-SSA1-1995. Bienes y Servicios. Etiquetado para productos de perfumería y belleza preenvasados.
 - 15 Maren, L. Van der; Líneas directrices de buenas prácticas de producción de productos cosméticos: traducción comentada del documento "Lignes directrices de bonnes pratiques de production des produits cosmétiques (BPPC)" publicadas por el Consejo de Europa en 1995. Generalitat de Catalunya. Departamento de Salud. Ed. Dirección General de Recursos Sanitarios. Primera edición: Barcelona, 2008. págs 64-65.
 - 16 Martin, M.C., M. Chivot, G. Peyrefitte. 1997. *Democosmética y Estética, cosmetología*. Vol. 3, ed. Masson, pp. 57.
 - 17 Morpeth F.F. 1995. Preservation of surfactant formulations. *Blackie Academic & Professional*; 147-84.
 - 18 Wilkinson, J.B., R.J. Moore. 1990. *Cosmetología de Harry*. Madrid: Díaz de Santos; 747-81.
 - 19 Orth DS, J.J. Kabara. 1998. Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs. *Cosm & Toil*; 113(4):51-8.
 - 20 Schülke and Mayr. 1993. The toxicology and tolerance of the cosmetic preservative. *Euxyl K135 (1-6) Reg. No. DES-15000003*.
 - 21 Yablonski J.J., S.E. Mancuso. 2002. Preservation of «atypical» cosmetic product systems. *Cosm & Toil*; 117(4):31.
 - 22 Orus P., S. Sonia Leranoz* Leranoz., 2005. *International Microbiology*, *MICROBIOL. INT.* ISSN 1139-6709. Madrid; 8(2).
 - 23 Norma Oficial Mexicana NOM-089-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza
 - 24 MERCOSUR, GMC. RES NO 66. 1996. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura para productos cosméticos.
URL: <http://www.anmat.gov.ar/Mercosur/cosmeticos/resolucionGMC>
 - 25 Ley Federal de Protección al Consumidor (última Reforma, DOF 10-06-2009)
 - 26 Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios. (DIARIO OFICIAL, Lunes 9 de agosto de 1999).
 - 27 Reglamento de la Ley Federal para la Protección del Consumidor (DIARIO OFICIAL)



EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA EN COSMÉTICOS

Los controles microbiológicos van dirigidos a la reducción o eliminación de los riesgos para el consumidor de los cosméticos. Hoy en día el control microbiológico de los cosméticos suelen dirigirse a los puntos críticos de control definidos mediante técnicas de análisis preventivos para controlar riesgos microbiológicos en materias primas y los productos terminados.

Estos métodos de evaluación microbiológica son principalmente:

- Cuenta Bacteriana Total.
- Recuento de bacterias mesófilas aerobias
- Identificación de microorganismos patógenos:

E.coli, Staphilococcus aureus, Ps. Aeruginosa, C. Albicans



3.1 Evaluación microbiológica de cosméticos en México.

Los procedimientos para evaluación de microorganismos descritos en la legislación NOM-089-SSA1-1994, Bienes y servicios son métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza presentes en un cosmético.

Cuenta total de hongos, levaduras y mesófilos aerobios

Toma de muestra del producto 1 g o ml

Observar si hay crecimiento en los medios inoculados:

Si no hay crecimiento reportar: menos de 10 UFC/ml o g de muestra. Concluyendo el ensayo. Si se presenta crecimiento, continuar con la prueba definitiva de Cuenta total de mesófilos aerobios, hongos y levaduras.

- Cuenta total de hongos y levadura: Contabiliza el número de hongos y levaduras que se encuentren.
- Cuenta total de mesófilos aerobios: Contabiliza las cajas en donde se encuentren de 25 a 250 UFC reportando el número de UFC/ml o g de muestra multiplicando por el inverso de la dilución observada.

Identificación de patógenos

Incubar los tubos de CLM utilizados para la cuenta estándar total y a partir de los tubos inoculados sembrar una azada en los siguientes medios de cultivo diferenciales: agar cetrimida, EMB, AMC y AVJ. Incubar y observar las cajas inoculadas para búsqueda de *E. coli*, *S. Typhi*, *S. aureus* y *Ps. sp.* en los medios respectivos (ver Tabla 1).



Tabla No. 1

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO	CARACTERISTICAS COLONIALES
Agar eosina azul de metileno	<i>E. coli</i>	Colonias pequeñas azul negro en la parte central con brillo metálico verdoso a la luz reflejada
	<i>Salmonella</i>	Transparentes, color ámbar
	<i>Staphylococcus coagulasa (+)</i>	Colonias incoloras, en punta de alfiler
Agar MacConkey	<i>Salmonella, Shigella</i> y otros	Incoloros, transparentes
	<i>E. coli</i>	Grandes, rojas, que pueden estar rodeadas de una zona de precipitación de bilis
	<i>Enterobacter, Klebsiella</i>	Grandes, rosadas, mucosas
Agar cetrimida	<i>Enterococos, Staphylococcus</i> y otros	Diminutas, de crecimiento aislado, opacas
	<i>Ps. sp.</i>	Colonias grandes blancas o verdes cremosas
	<i>E. coli</i>	Crece poco, sin pigmento
Agar Vogel Johnson	<i>S. aureus</i>	No crece
	<i>S. aureus</i>	Colonias pequeñas, negras, con halo amarillo.
	<i>S. epidermidis</i> y otros	Pequeñas, negro-grisáceas, sin halo
	<i>E. coli</i>	No crece
	<i>Ps. aeruginosa</i>	No crece

Fuente: NOM-089-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza.

Tinción de Gram

Si se observan colonias sospechosas de los microorganismos antes mencionados, de acuerdo a la Tabla No. 1, realizar una tinción de Gram para identificar morfología microscópica. Observar al microscopio con objetivo de inmersión.



Las bacterias Gram positivas, se observan teñidas de color azul violáceo intenso.

Las bacterias Gram negativas se observan de color rojo.

Identificación de *S. aureus*

En caso de encontrar cocos en racimo Gram positivos, continuar con las pruebas para búsqueda de *S.aureus*.

+ Prueba de catalasa

+ Aislar la colonia sospechosa en ALM

+ Aislar en agar de sal y manitol o AVJ y observar si hay desarrollo microbiano.

Sembrar las colonias sospechosas en dos tubos con BHI, uno destinado para la técnica de coagulasa y otro para la técnica de termonucleasa.

Reportar de acuerdo a la Tabla No. 2

Tabla No. 2

CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE *S. aureus*

DETERMINACION	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
Prueba de catalasa	+	-	-
Fermentación de manitol	+	-	-
Crecimiento en O/F	fermentativo		
Prueba de Coagulasa	+	-	-
Prueba de Termonucleasa	+		
Vogel Proskauer	+		-
Oxidasa	-		-
Reducción de nitratos	+		d

d= variable

Fuente: NOM-089-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza.



+ Prueba de coagulasa: Correr en paralelo el mismo procedimiento con el testigo, éste debe dar la prueba positiva. La presencia de un coágulo dará la prueba positiva

Si al transcurrir el tiempo no se observa coágulo, la prueba se considera negativa.

NOTA: No todos los tipos de *S. aureus* son coagulasa positiva.

+Prueba de la termonucleasa: Al otro tubo sembrado en BHI, practicar la prueba de la termonucleasa, corriendo dicha prueba con un control positivo. Transcurrido el tiempo de incubación, observar vire del agar de morado a violeta o rosa y la presencia de halo.

Se da como positiva la prueba con la presencia de un halo color rosa alrededor de los orificios que indican hidrólisis del DNA.

Reportar: *Staphylococcus aureus* termonucleasa positiva.

Pruebas bioquímicas a emplear: Prueba de oxidasa, Prueba en TSI, Prueba en LIA, Prueba en medio basal O/F (de Hugh y Leifson), Prueba en agar citrato de Simmons, Prueba en caldo urea, Prueba en medio MR-VP, Prueba del rojo de metilo, Prueba de Voges-Proskauer, Prueba en Medio indol, Formación de nitritos, Formación de indol, Prueba en medio SIM, Prueba en medio MIO, Prueba en caldo lisina descarboxilasa.



Identificación de *Pseudomona sp.*

En caso de que en el medio agar cetrimida se encuentren colonias sospechosas de *Pseudomona sp.*, realizar la prueba de oxidasa y una tinción de Gram (Tabla No. 3).

Observar con luz ultravioleta las colonias desarrolladas y comparar la morfología colonial conforme a la Tabla No. 3.

Tabla No. 3

CARACTERISTICAS DE *Pseudomona sp.*

Medio de cultivo	Morfología colonial	Tinción de Gram	Prueba de oxidasa
Agar cetrimida a 37°C o 42°C	Colonias grandes blancas o verdes cremosas.	Bacilos —	+
Agar Pseudomonas F para obtención de fluoresceína	Colonias incoloras o amarillentas, con luz ultravioleta se observan de color amarillento.	Bacilos — Bacilos —	+ +
Agar Pseudomonas P para detección de piocianina	Colonias verde-azulosas. Con luz ultravioleta se observan de color azul.		

Fuente: NOM-089-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza.

La presencia de *Pseudomona sp.* puede confirmarse, si es necesario, con pruebas bioquímicas mencionadas con anterioridad para *Staphylococcus aureus* y comparar con la Tabla No.4.



Tabla No. 4
Pseudomona sp.

Pruebas bioquímicas	Resultado
H ₂ S (formación)	-
Movilidad	+
Indol	-
Urea	d
Lisina descarboxilasa	-
Lactosa	-
VP	d
Citrato de Simmons	+
Manitol	d
Glucosa (gas)	d
Sorbitol	-
Inositol	-
OF/F	-
OF/O	+

+ = Positivo
- = Negativo
d = Variable

Fuente: NOM-089-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza.

Identificación de *Salmonella sp.*

En caso de que en los medios EMB o AMC se encuentren colonias sospechosas de *Salmonella* (cuadro No. 1), sembrarlas en medio caldo cistina-selenito y caldo tetracionato. Pruebas selectivas para *Salmonella sp.* Si se presenta crecimiento en cualquiera de los medios de enriquecimiento, tomar una azada y aislar por estría cruzada en los siguientes medios: agar verde brillante, agar XLD y agar sulfito de bismuto.



Si son bacilos Gram negativos, correspondiendo a la morfología de *Salmonella sp.*, sembrar por estría y punción en el medio agar triple azúcar-hierro. Observar las morfologías coloniales y microscópicas y compararlas con las descritas en la Tabla No.5.

Tabla No. 5
CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS DE *Salmonella sp.*

Medio de cultivo	Características morfológicas	Tinción de Gram
Agar verde brillante	Colonias pequeñas transparentes, incoloras, rosas o blancas opacas, frecuentemente rodeadas de una zona rosa o roja.	Bacilos —
Agar xilosa-lisina desoxicolato	Colonias rojas con o sin centro negro.	Bacilos —
Agar sulfito de bismuto	Colonias negras o verdes	Bacilos —
Agar hierro triple azúcar	Superficie alcalina (roja) punción ácida (amarilla), con o sin producción de ácido sulfhídrico (negro)	Bacilos —

Fuente: NOM-089-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza.

Para confirmación de *Salmonella* realizar las pruebas bioquímicas mencionadas para *Staphylococcus aureus* y comparar con la Tabla No. 6.



Tabla No. 6
Salmonella typhi

Pruebas bioquímicas		Resultado
TSI:	Superficie	K
	Punción	A
	Gas	-
	H ₂ S	+
LIA:	Superficie	K
	Punción	K
	Gas	-
	H ₂ S	+ (-)
MIO:	Movilidad	+(-)
	Indol	-
	Ornitina	-
Urea	-	
	Lisina descarboxilasa	+
	Malonato	-
	Lactosa	-
	VP	-
	Citrato de Simmons	-
	Manitol	+
	Glucosa (gas)	-
	Sorbitol	+
	Ornitina Descarboxilasa	-
	Dulcitol	d
	Inositol	-
	Triolosa	+
	Arabinosa	-
	Ramnosa	-
	Celobiosa	d
	Eritritol	-
	Acetato de sodio	-
	Mucato	-
	Fucsina glicerol	-

K= Alcalino

A= Acido

+ = Positivo

- = Negativo

d= Variable

Fuente: NOM-089-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza.

Pruebas selectivas para *Escherichia coli*.



En caso de que encuentren colonias sospechosas de *E. coli* (Tabla No. 1), sembrar por estría cruzada en los medios AMC y agar Levine-eosina azul de metileno e. Observar el crecimiento y sin ninguna colonia corresponde a la morfología descrita en la Tabla No.1, la muestra cumple los requisitos de ausencia de *Escherichia coli*. Confirme la presencia utilizando las pruebas bioquímicas mencionadas en los puntos de la identificación de *Staphylococcus aureus* y comparar con la Tabla No. 7.

Tabla No. 7

Escherichia coli

	Pruebas bioquímicas	Resultado
TSI:	Superficie	A
	Punción	A
	Gas	+
	H ₂ S	-
LIA:	Superficie	K
	Punción	A



	Gas	+
	H ₂ S	-
MIO:	Movilidad	+(-)
	Indol	+
Urea		-
Lisina descarboxilasa		+
Malonato		-
Lactosa		+
VP		-
Citrato de Simmons		-
Manitol		+
Glucosa (gas)		A
Sorbitol		+
Ornitina descarboxilasa		d
Dulcitol		d
Inositol		-
Triolosa		+
Arabinosa		+
Ramnosa		d
Eritritol		-
OF/F y OF/O		+
Mucato		+

K= Alcalino

A= Acido

+ = Positivo

- = Negativo

d = Variable

Fuente: NOM-089-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza.



Pruebas bioquímicas API

Aislar la colonia sospechosa en ALM y los medios diferenciales que se mencionan: EMB (*E. coli*), AMC (*S. typhi*) y agar cetrimida (*Ps. sp.*). Sembrar el sistema API, siguiendo las indicaciones del fabricante. Leer las bioquímicas e identificar al microorganismo haciendo uso del manual de códigos. Corroborar que la morfología colonial de los medios diferenciales sea la correspondiente al microorganismo identificado por el sistema API.

La concordancia con normas internacionales de esta norma no tiene marco de referencia.

3.2 Métodos de Conteo Viable.

Los métodos de cuenta viable son empleados para enumerar las poblaciones microbiológicas presentes en una muestra por lo regular en 1 g o ml, debe tener énfasis y cuidados en la proliferación. El fundamento de estos conteos dependerá de la habilidad de los microorganismos para desarrollarse en medios líquidos, semilíquidos o sólidos seleccionados cuidadosamente a las necesidades de crecimiento de las bacterias de interés¹.

El conteo de poblaciones microbianas por dilución en placa es un método simple y rápido para la cuenta viable de células microbianas, este método de dilución en placa se fundamenta en que cualquier célula viable inoculada en un medio de cultivo se multiplica y produce datos de fácil identificación, como la formación de colonias en placas de agar.



Recuento de mesófilos aerobios

Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables en un producto, la técnica comúnmente utilizada es la cuenta en placa. Este método consiste en la preparación de una serie de diluciones de una muestra en diluyente apropiado, depositando una alícuota de una dilución sobre la superficie de un medio de cultivo sólido e incubando la placa de agar bajo condiciones ambientales apropiadas. La dilución debe permitir generar colonias separadas, cada colonia puede proceder de una sola célula o de una agrupación (unidad viable), la cual contará como una bacteria. Bajo este fundamento, estas placas pueden ser usadas no sólo para el conteo de poblaciones microbianas, sino también para el aislamiento de organismos. Un Medio selectivo o no selectivo puede ser utilizado dependiendo de la naturaleza del microorganismo que se desea aislar².

En realidad esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes. La variedad de especies y tipos diferenciables por sus necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc., hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente y la misma refleja si el manejo sanitario del producto ha sido el adecuado.

Por otra parte como estos resultados sean reproducibles y por lo tanto significativos, es de suma importancia seguir fielmente y controlar cuidadosamente las condiciones de prueba³. Si es muestra líquida homogeneizarla.



No es recomendable que el producto llene totalmente el recipiente para evitar escurrimientos y contaminación.

Para muestras sólidas se pesan 10 gramos y se diluyen en 90 ml de solución diluyente, se licua o se puede usar un mortero estéril. Se considera como la primera dilución. Para las diluciones sucesivas se usan pipetas diferentes inoculando simultáneamente a las cajas petri. El volumen que se transfiera nunca será menor del 10% de la capacidad total de la pipeta, por ejemplo para 0.1 ml no se usa una pipeta de más de 1 ml.

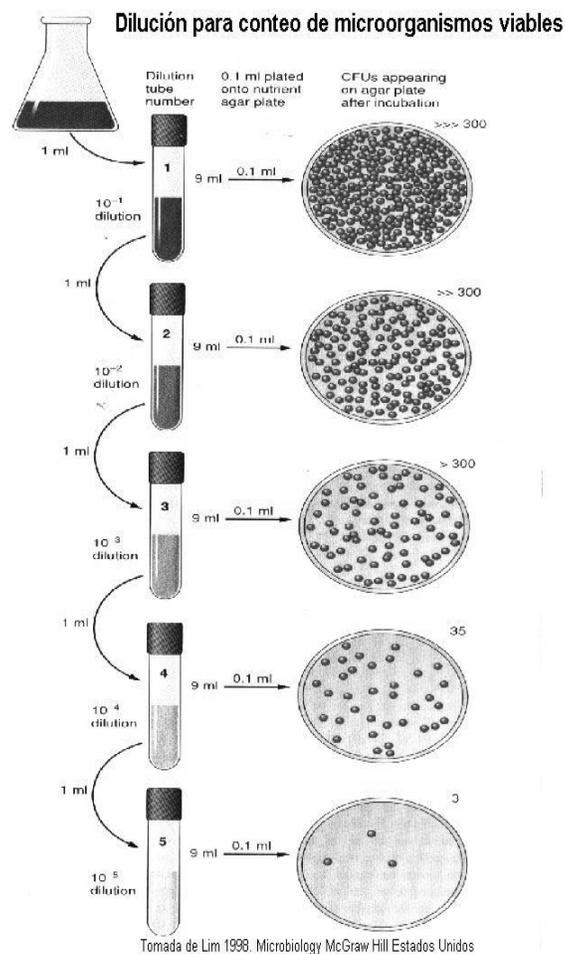


Figura 3.1 a) Conteo de microorganismos viables.
Fuente: Lim 1998. Microbiology McGraw Hill Estados Unidos



Cuenta total

Consiste en contar colonias que se desarrollan después de cierto tiempo en el medio de elección presupone que cada colonia proviene de un microorganismo en la muestra.

La cuenta de bacterias totales de una muestra se refiere a las bacterias heterótrofas presentes en una muestra con crecimiento en presencia de oxígeno libre²⁷.

1. Seleccionar aquellas placas donde aparezcan de 30 a 300 colonias, pues hay menor error en el conteo.
2. Contar todas las colonias de la placa. Si el número se estima mayor de 300 y no hay diluciones subsecuentes:
3. 301-500 colonias se divide en dos partes y el número de colonias contadas se multiplica por 2.
4. 501-800 colonias se divide en cuatro partes y el número de colonias contadas se multiplica por 4.
5. >800 colonias se cuentan de 10 a 20 cuadros se promedia y se multiplica por el número de cuadros que ocupa la caja.
6. El número de colonias contadas deberá ser multiplicada por el inverso de la dilución y considerar si la técnica fue por vertido o por superficie (debido al volumen de la muestra).
7. Redondear la cifra obtenida en el recuento de tal forma que haya dos dígitos al inicio de la cifra.



Por ejemplo:

129 se reporta 130
2,417 se reporta 2400
49 se reporta 49

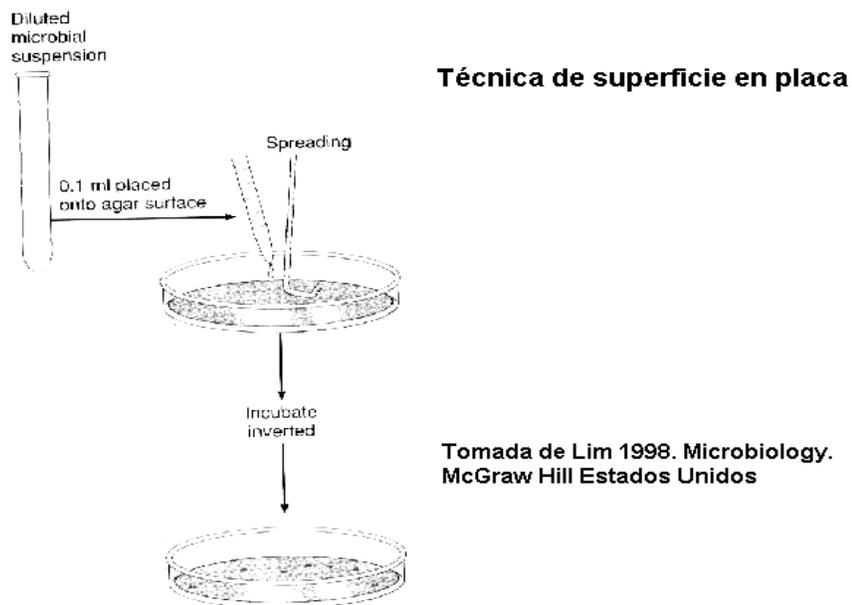
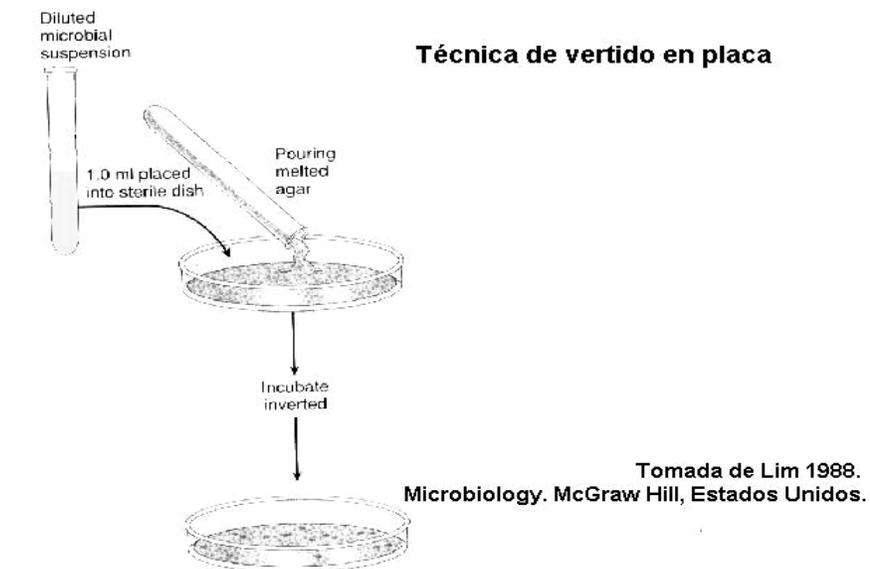


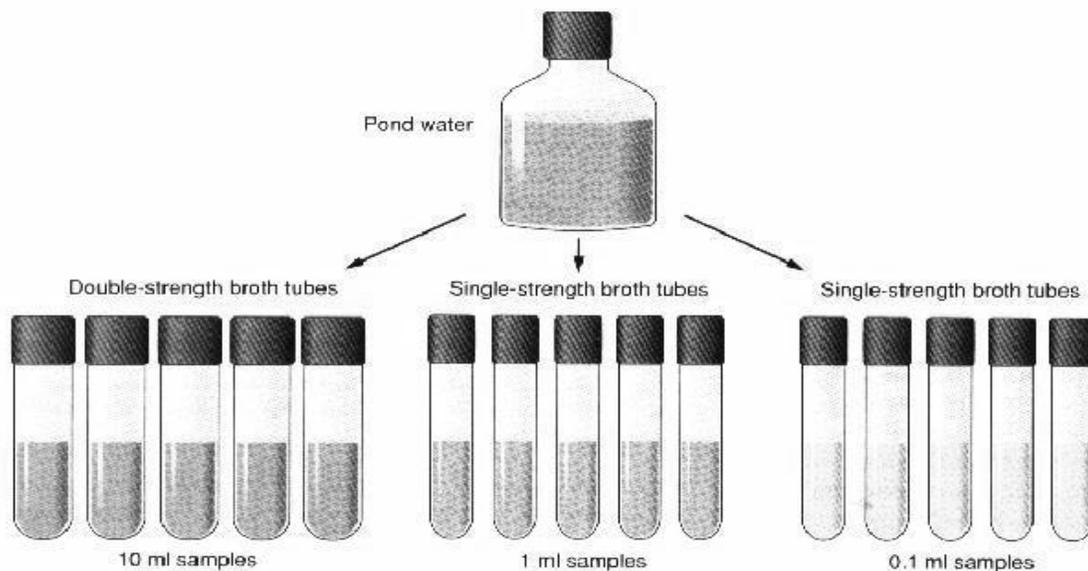
Figura 3.1 b) Cuenta en Placa
Fuente: Lim 1998. Microbiology McGraw Hill Estados Unidos



Numero Más Probable (NMP)

EL METODO DE NUMERO MAS PROBABLE (NMP) es una estrategia eficiente de estimación de densidades poblacionales especialmente cuando una evaluación cuantitativa de células individuales no es factible. La técnica se basa en la determinación de presencia o ausencia (Gram positivos o negativos) en réplicas de diluciones consecutivas de atributos particulares de microorganismos presentes en muestras de suelo u otros ambientes. Por lo tanto, un requisito importante de este método es la necesidad de poder reconocer un atributo particular de la población en el medio de crecimiento a utilizarse. El estimado de densidad poblacional se obtiene del patrón de ocurrencia de ese atributo en diluciones seriadas y el uso de una tabla de probabilidad.

Para realizar la estimación microbiana se utiliza un mínimo de tres diluciones y un intervalo de 3 a 10 replicas (“n” tubos de medio de crecimiento) por dilución; el número de diluciones y réplicas utilizadas estará en función de la precisión requerida.



Técnica del Número Más Probable

Tomada de Lim 1998. Microbiology McGraw Hill Estados Unidos.

Figura. 3.1 c) Técnica del Número más probable.
Fuente: Lim 1998. Microbiology McGraw Hill Estados Unidos

Actualmente, existen tablas estándar como las publicadas por la FDA o NACE para estimar el número de microorganismos más probable. Estas tablas están limitadas a tres diluciones ya 3, 5 y 10 réplicas por dilución; sin embargo, también existen programas de computadora (MPN Calculator)TM, “Chem SW”) para obtener la estimación microbiana empleando más de tres diluciones y un número mayor de replicas.



Tabla 1. El número más probable para series de diluciones en réplicas de cinco por nivel de dilución (Woomer, 1994)*.

Núm. Respuestas Pos. por Nivel de Dilución	Población estimada	Núm. Respuestas Pos. por Nivel de Dilución	Población estimada
1-2-3-4-5-6		1-2-3-4-5-6	
1-0-0-0-0-0	1.9	5-5-4-2-0-0	2159
1-1-0-0-0-0	4.0	5-5-4-3-0-0	2716
2-0-0-0-0-0	4.4	5-5-5-0-0-0	2305
2-1-0-0-0-0	6.8	5-5-5-0-1-0	3126
3-0-0-0-0-0	7.7	5-5-5-1-0-0	3282
3-1-0-0-0-0	10	5-5-5-1-1-0	4532
3-2-0-0-0-0	13	5-5-5-2-0-0	4922
4-0-0-0-0-0	12	5-5-5-2-1-0	6918
4-1-0-0-0-0	16	5-5-5-3-0-0	7797
4-2-0-0-0-0	21	5-5-5-3-1-0	10702
4-3-0-0-0-0	27	5-5-5-3-2-0	13826
5-0-0-0-0-0	23	5-5-5-4-0-0	12753
5-0-1-0-0-0	31	5-5-5-4-1-0	16902
5-1-0-0-0-0	33	5-5-5-4-2-0	21589
5-1-1-0-0-0	45	5-5-5-4-3-0	27150
5-2-0-0-0-0	49	5-5-5-5-0-0	23054
5-2-1-0-0-0	69	5-5-5-5-0-1	31225
5-3-0-0-0-0	78	5-5-5-5-1-0	32720
5-3-1-0-0-0	107	5-5-5-5-1-1	45261
5-3-2-0-0-0	138	5-5-5-5-2-0	49224
5-4-0-0-0-0	127	5-5-5-5-2-1	69148
5-4-1-0-0-0	169	5-5-5-5-3-0	78127
5-4-2-0-0-0	216	5-5-5-5-3-1	107022
5-4-3-0-0-0	270	5-5-5-5-3-2	138269
5-5-0-0-0-0	230	5-5-5-5-4-0	127528
5-5-0-1-0-0	312	5-5-5-5-4-1	169028
5-5-1-0-0-0	327	5-5-5-5-4-2	215899
5-5-1-1-0-0	453	5-5-5-5-4-3	271557
5-5-2-0-0-0	488	5-5-5-5-4-4	334051
5-5-2-1-0-0	692	5-5-5-5-5-0	230546
5-5-3-0-0-0	780	5-5-5-5-5-1	328192
5-5-3-1-0-0	1070	5-5-5-5-5-2	492238
5-5-3-2-0-0	1383	5-5-5-5-5-3	781272
5-5-4-0-0-0	1275	5-5-5-5-5-4	1312535
5-5-4-1-0-0	1690		

* Esta es la densidad poblacional estimada asumiendo 1 ml de inóculo. Este valor debe ser ajustado por el factor de dilución y el volumen de inóculo (por ejemplo, si usted inoculó en cada placa un volumen de 10 µl, entonces el valor de la tabla debe ser corregido multiplicándolo por 100 [10 X 100 = 1,000 µl ó 1 ml]).

Fuente: Woomer, P.1994. L. **Most Probable Number Counts**. En: Mickelson, S.N. (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. E.E.U.U. Soil Society of America, Inc.

Algunas de las ventajas del NMP son:

- la capacidad de estimar tamaños poblacionales basados en atributos relacionados a un proceso (selectividad); por ejemplo se puede determinar la densidad poblacional de organismos que pueden nodular leguminosas en una muestra de suelo usando el método de infección de plantas,



-
- provee una recuperación uniforme de las poblaciones microbianas de suelos diversificados,
 - determina sólo organismos vivos y activos metabólicamente.
 - suele ser más rápido e igual de confiable que los métodos tradicionales de esparcimiento en placa ²⁷.

3.3 TÉCNICAS ACTUALES EN LA INDUSTRIA COSMÉTICA

Comparado con otros campos los métodos rápidos y automatizados en microbiología han contado con un desarrollo lento, una de las razones es el tiempo relativamente alto del tiempo de reacción del crecimiento de los cultivos. En la industria los procedimientos constituyen una parte substancial del tiempo involucrado en la prueba así que una técnica automática contribuye considerablemente al término y velocidad de las pruebas.

El desarrollo de pruebas microbiológicas rápidas depende del desarrollo de más técnicas sensibles para la detección y crecimiento para la actividad de los microorganismos. Actualmente el futuro de las nuevas técnicas que son empleadas hoy en día tendrá que sortear la limitante del tiempo involucrado⁴.

3.3.1 Diferencia de voltaje.

La actividad bacteriana puede ser detectada monitoreando los cambios en el voltaje eléctrico de los medios de cultivos inoculados contra el voltaje de un medio de cultivo estéril a través de la conductividad en una celda.



Bacterias patógenas han sido estudiadas obteniendo curvas características para una rápida identificación. La velocidad de respuesta es proporcional a la concentración inicial del microorganismo.

La resistencia eléctrica para un medio que contiene actividad de microorganismos cambia con el tiempo es en este curso lo indica la posibilidad de utilizar la impedancia para monitorear la actividad bacteriana. Un método o equipo empleando estos principios tiene ventajas inmediatas ofreciendo alta sensibilidad por medio de distintos aparatos que son comparados con otros métodos de monitoreo del crecimiento bacteriano como sistemas fotométricos o contador Coulter. La impedancia de un medio inoculado cambia por lo tanto un 4 % desde que es inoculado hasta el tiempo que alcanza la fase estacionaria. Esta diferencia en los cambios de impedancia puede ser medida fácilmente con la utilización de puentes de circuitos.

La exploración en este campo ha sido limitada tal vez debido a las dificultades asociadas a la detección de cambios en la impedancia, lectura susceptible al medio ambiente como el ocasionado por la evaporación de agua, Variación de temperatura, reacciones electroquímicas y otros procesos que pueden enmascarar la señal de los cultivos con actividad microbiana, las variaciones de temperatura por ejemplo afectan a el valor de impedancia alrededor de 2 % por grado centígrado. Es posible reducir el efecto del proceso estabilizando la temperatura y controlando la evaporación pero este control es limitado al considerar las variaciones de la práctica.



Al inicio se fabricaron celdas especialmente diseñadas para la medición de la impedancia hecha de vidrio capilar con electrodos de oro plateados al final. Al ser disponibles las celdas no requieren lavado o esterilización. Estos capilares fueron aislados para reducir la evaporación y los resultados de las mediciones comparadas con las lecturas de conteos viables por medios tradicionales fue extrapolable generando así curvas de crecimiento similares del crecimiento viable del microorganismo.

La relación indica que los cambios en la impedancia son causados por un efecto acumulativo en el tiempo debido a la acumulación de metabolitos del microorganismo. En términos absolutos la impedancia de un cultivo decrece continuamente con el tiempo indicativo que el microorganismo metaboliza substratos de baja conductividad como los carbohidratos dentro de la bacteria productos de alta conductividad como el ácido láctico. El efecto de la impedancia en las celdas con bacteria es de incremento en el voltaje y la velocidad de la respuesta dependerá de la concentración y actividad de microorganismos ²⁹. Desde los años 70's han buscado alternativas más rápidas que la técnica tradicional de conteo en placa, métodos de labor intensiva por la preparación de material, inoculación de diluciones y lenta incubación de placas, posterior evaluación y conteo visual. Los métodos rápidos son una solución al tiempo de preparación y respuesta a obtención de resultados en menor tiempo una de estas alternativas es la detección de microorganismos por conductancia en la industria cosmética. Un cambio significativo en la conductancia se presenta en las celdas



cuando la concentración de los microorganismos se encuentra alrededor de 10^5 y 10^6 UFC/ ml.

Estos principios forman la base para el desarrollo de analizadores microbiológicos comercialmente viables como el Malthus System V, instrumento con temperatura constante en las celdas que contienen las muestras. Este equipo contaba con una capacidad de 60,120 o 240 pruebas simultáneamente controlado por una computadora⁵.



Figura 3.3.1 .a) Sistema Malthus V

Un equipo que se encuentra en el mercado y que se emplea en la industria cosmética para el control de materias primas, formulas y producto terminado es el Bactometro ®, equipo que cuenta con el fundamento básico de la impedancia para la detección de microorganismos presentes en alguna de las muestras analizadas.

Los modelos donde se realiza el análisis son controlados a través de un ordenador con el programa específico acoplado con una impresora, así los datos pueden pasar directamente a un registro documental adicional al de la propia computadora.



Figura 3.3.1. b) Bactometro® Capacidad de análisis de hasta 256 muestras; 16 celdas para muestra en cada Modulo con resultado en 24hrs.

El resultado de este análisis es para la aprobación y liberación del producto una vez fabricado y acondicionado siendo una técnica alternativa a la tradicional de conteo total en placa. De esta forma se obtienen resultados más rápidos de hasta 2 días menos en comparación con el método tradicional de conteo viable total en placa.

Así como prioridad para la empresa que quiere poner a disposición mayor producto en un menor tiempo el Bactometro® presenta una opción ya que si bien el procedimiento de análisis de la muestra inicial no exime de una fase líquida en medio nutritivo y será adecuado a las necesidades de cada empresa, representa una reducción en los insumos que puedan emplearse ya que después de la fase de enriquecimiento la muestra se coloca en módulos donde a través de celdas con electrodos se mide la impedancia de las muestras contra una muestra testigo que se encuentra tratada en las mismas condiciones pero negativa a la presencia de microorganismo.



Cabe señalar que el equipo, insumos y servicios de mantenimiento al tratarse de tecnología nueva siempre se encontraran más elevados que un procedimiento tradicional de placa.

3.3.2 Citometría de Flujo.

Un nuevo sistema de análisis rápido para el completo control de Calidad Microbiológico en la industria cosmética es la citometría de Flujo. En la industria cosmética y productos de cuidado personal la seguridad microbiológica es alcanzada a través de los controles efectuados a materias primas, producto en granel y producto terminado. Dos de las técnicas más utilizadas para el conteo de la contaminación por microorganismos son el método cuenta total o prueba Presencia – Ausencia y Conteo Total en placa que se basan en métodos de cultivo enriquecidos con resultados semicualitativos adicional al tiempo de resultado estas técnicas tienen consecuencias en los costos de material requerido para la aprobación y liberación microbiológica por lo que se necesita los procesos para contribuir la producción al igual que prevenir incidentes de contaminación durante la fabricación o acondicionamiento.

La búsqueda de nuevas pruebas con métodos alternativos en este rubro de Presencia- Ausencia se describe desde los años 80's teniendo como base la premisa de una detección y resultados en un tiempo de 24-48 horas por métodos indirectos.



La citometría de Flujo es un método de análisis celular multiparamétrico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al incidir en una fuente de luz. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad y por supuesto, cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo. Las aplicaciones más relevantes de la citometría de flujo por mencionar algunas se relacionan con la hematología e inmunología y en fechas más recientes aplicada en control de microorganismos en productos tan diversos como lo son alimentos, bebidas y cosméticos. En el momento de realizar las mediciones en el citómetro de flujo, las células pueden estar vivas o fijadas pero obligadamente en una suspensión celular y en forma de célula única.

Al obligarlas a pasar alineadas una a una frente a un haz láser mediante un flujo continuo, cada célula, a la vez que dispersa la luz, emite fluorescente como consecuencia de la excitación láser a la que es sometida.



Los parámetros que típicamente se miden de forma simultánea por cada célula son:

1. Dispersión frontal de la luz a 2 valor proporcional al tamaño celular.
2. Dispersión de la luz ortogonal, proporcional a la cantidad de estructuras granulares o complejidad de la célula.
3. Intensidades de fluorescencia a diferentes longitudes de onda.

Los citómetros de flujo están formados por complejos sistemas de fluido, óptica láser, detectores electrónicos, convertidores analógico-digitales y digitales y computadoras. Los sistemas ópticos permiten el enfoque láser en un haz con un diámetro reducido para impactar sobre el menor número de partículas posibles simultáneamente.

El sistema de fluido permite un enfoque hidrodinámico del flujo celular hasta conseguir el alineamiento de las partículas o células, y en los separadores se produce una ruptura del flujo en gotas de tamaño uniforme para conseguir la separación de células individuales.

El sistema electrónico se encarga de la cuantificación de los destellos de fluorescencia y de la luz dispersa y bajo el control de la computadora, se consigue la carga electrónica de las gotas que contienen las células de interés para poder someterlas a deflexión y recogerlas en tubos específicos para tal fin.

La computadora permite almacenar datos de miles de células por cada muestra y representar los resultados gráficamente.



Tomando como partida estos preceptos y fundamentos y partiendo de las necesidades en el campo de producción de cosméticos se comienza así el desarrollo del sistema D-Count® de Chemunex, diseñado para proveer a la industria Cosmética y de cuidado personal de un método rápido con datos sensibles de Presencia – Ausencia de microorganismos en los productos fabricados. El D-Count ofrece por primera vez a las plantas de manufactura la oportunidad de implementar la Calidad en tiempo real para microbiología.

EL sistema D-count combina la fluorescencia con etiquetaje de célula viable y citometría de flujo digital en un sistema poderoso de detección. Las muestras que son cargadas en el sistema autónomo D-Count son tratadas con reactivos Fluorassure®, así el marcaje se basa en la no fluorescencia del sustrato sino en el citoplasma de células viables que es fijado enzimáticamente para en una etapa posterior liberar fluorocromos que son detectados por el sistema de computo acoplado a un software específico.

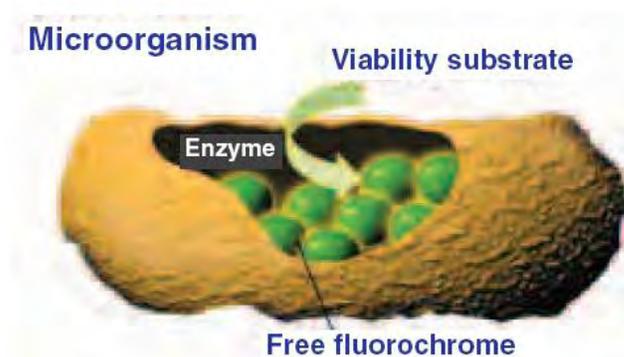


Figura 3.3.2 a) Fijación de sustrato en célula viable con integridad de membrana
Fuente: FOOD NEWS SOFT DRINKS December 2006 Pág.8



Únicamente las células viables con integridad en la membrana cuentan con la habilidad de realizar la fijación del sustrato de Fluorassure[®] y no requiere de multiplicación. Posterior al marcaje de la célula presuntamente presente en la muestra, se inyecta en un flujo que pasa por una celda de cuarzo en el analizador del D-Count. Este flujo asegura que los microorganismos pasan por el láser de excitación uno por uno.

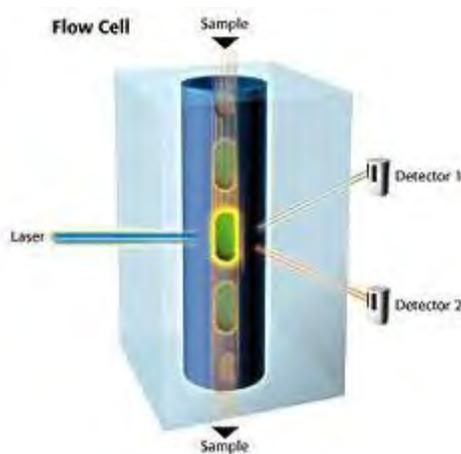


Figura 3.3.2 b) Flujo de la inyección de la muestra con el marcaje de la célula viable.

Cada célula es llevada al láser individualmente.

Fuente: FOOD NEWS SOFT DRINKS December 2006 Pág.9

Las señales de fluorescencia proveniente de la celda son colectadas por detectores sensibles y analizadas por un software. Teniendo en el D-Count un sistema discriminativo de microorganismos viables incluyendo las esporas. Los resultados son desplegados como conteo directo después de 90 minutos de haber iniciado la prueba en el equipo. No necesita interpretación de los resultados ya que se valida comparando directamente con un conteo en placa.

La mayoría de los productos líquidos pueden ser cargados directamente al equipo pero algunas muestras requerirán de un tratamiento previo.



Más de 64 muestras pueden ser analizadas en un solo ensayo y puede procesar alrededor de 60 muestras por hora. Claramente se ven reducidos los periodos de incubación en hasta 3 días además del alto grado en la sensibilidad, seguridad y fiabilidad de los resultados demostrando ventajas significativas con otros métodos rápidos⁶.



Figura 3.3.2 c) Bactiflow ALS ® Capacidad de 25 pruebas con resultado en un tiempo de 90 minutos.

Bactiflow ALS® de Chemunex es también otro de los sistemas automatizados que se emplea por la industria cosmética a nivel internacional buscando con ello asegurar la conformidad de los componentes para la elaboración de los productos como los productos terminados. A diferencia de D-count ® Bactiflow ALS ® tiene capacidad para 25 muestras pero su fundamento y resultados son por citometría de flujo.



-
- ¹ **Grigorova R. and J.R. Norris** "Methods in Microbiology" Vol. 22 Ed. Academic Press. 1990. Capítulo 1.
 - ² **Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados.** Instituto Nacional de Ecología, 2006, 180 pp.
 - ³ Norma Oficial Mexicana **NOM-092-SSA1-1994**, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa
 - ⁴ **Hedén, Carl-Göran and Illéni Tiber** "New Approaches to the identification of microorganisms" John Wiley & Sons, Inc. 1975 Chapter 5.
 - ⁵ **Tempelaars C.** "The use of conductance microbiology in the cosmetics and toiletries industry. Cosmetic and Toiletries Manufacture Word Wide.
 - ⁶ **Ludovic P.**"A new rapid analysis system for complete Microbial Quality Control in the cosmetic industry." SÖFW-Journal, 126.Jahrgang 6-2000.



IV

GLOSARIO

Características organolépticas: características de las sustancias y productos que se refieren al perfil sensorial identificado por: aspecto, color, olor y sabor.

Conservadores: sustancias adicionadas a los Productos de Higiene Personal, Cosméticos y Perfumes con la finalidad primaria de preservarlos de daños y o deterioros causados por microorganismos durante su fabricación y almacenamiento, así como proteger al consumidor de contaminación inadvertida, durante el uso del producto.

Consumidor: la persona física o moral que adquiere, realiza o disfruta como destinatario final bienes, productos o servicios. Se entiende también por consumidor a la persona física o moral que adquiera, almacene, utilice o consuma bienes o servicios con objeto de integrarlos en procesos de producción, transformación, comercialización o prestación de servicios a terceros.

Control sanitario: Conjunto de acciones de orientación, educación, muestreo, verificación y en su caso, aplicación de medidas de seguridad y sanciones, que



ejerce la Secretaría de Salud con la participación de los productores, comercializadores y consumidores, en base a lo que establecen las normas oficiales mexicanas y otras disposiciones aplicables.

Envase primario (AC), todo recipiente destinado a contener un producto y que entra en contacto con el mismo, conservando su integridad física, química y sanitaria.

FDA. Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Fármacos, por sus siglas en inglés) es la agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos (tanto para seres humanos como para animales), suplementos alimenticios, medicamentos (humanos y veterinarios), cosméticos, aparatos médicos (humanos y animales), productos biológicos y productos eméticos.

Granel. Producto ya fabricado antes de ser envasado.

Lote: cantidad de un producto obtenido en un ciclo de producción, de etapas continuas y que se caracteriza por las mismas especificaciones de forma homogénea relacionado con la fecha de elaboración.

NACE: Nomenclatura Estadística de Actividades Económicas de la Unión Europea

Producto Terminado: Todo aquel producto que ha completado el proceso de fabricación y acondicionado en la planta de fabricación.

Producto semiterminado: Todo aquel producto que se encuentra en una etapa intermedia al proceso de acondicionado en la planta de fabricación.



Productos higiénicos: Los materiales y sustancias que se apliquen en la superficie de la piel o cavidades corporales y que tengan acción farmacológica o preventiva.

Productos de perfumería y belleza para uso facial o corporal: Cosméticos, a los productos de perfumería y belleza que a través de medios técnicos adecuados pueden modificar el olor natural del cuerpo y mantener y perfeccionar su estética.



V

DISCUSIÓN

La industria cosmética manufactura productos que aunque no son estériles si cuentan con una concentración de microorganismos que no debe sobrepasar los límites establecidos en concentración y tipo específico, para ello las materias primas necesarias para su elaboración y susceptibles a una contaminación por microorganismos, procesos de fabricación y acondicionamiento deben estar monitoreados constantemente con la finalidad de asegurar la conformidad microbiológica de estos productos en el mercado.

Es por ello que se establecen límites y métodos para asegurar la calidad microbiológica de los productos cosméticos con un control microbiológico con fundamento en las técnicas microbiológicas desarrolladas para la identificación y cuantificación de microorganismos basados en la microbiología tradicional empleando cuentas microbianas en medios sólidos. Los resultados son obtenidos de manera adecuada pero con la limitante de las fases de elaboración, preparación y análisis de las muestras.



La evolución de nuevas tecnologías en conjunto con el estudio de los microorganismos ha hecho posible la aplicación de nuevos análisis microbiológicos para la evaluación, detección y conformidad de cosméticos puestos a la venta dentro de la población de una manera más eficiente y moderna. Técnicas como la impedancia que se considera uno de los mejores métodos para el recuento de microorganismos por obtener resultados en un tiempo menor y un consumo de trabajo óptimo en comparación a los protocolos tradicionales ha sido adoptada por la industria de los cosméticos, atribuyendo su ventaja a que pesar del desarrollo de los microorganismos se encuentren en suspensión, mientras se encuentren vivos su metabolismo cambia permitiendo detectar las propiedades eléctricas de su entorno detectado por sistemas de análisis automatizados sensibles a las diferencias de voltaje.

A la impedancia en fechas más recientes se suma la citometría de flujo, que basada en el marcaje de bacterias viables en combinación con la aplicación de fluorescencia con láser; son el fundamento de un método de tecnología digital que provee de resultados de detección microbiana reduciendo el tiempo de incubación, aumentando el tiempo de respuesta y acciones correctivas ante incidentes de contaminación en el proceso de manufactura y por supuesto asegurar la calidad microbiológica de cosméticos.

Las técnicas de evaluación microbianas tradicionales son una herramienta básica que con estándares internacionales y nacionales contribuyen a que las empresas dedicadas a la manufactura de productos cosméticos ofrezcan al consumidor la



conformidad microbiológica. Los métodos tradicionales de conteo en placa o número más probable aún son herramientas básicas que emplea la industria del ramo ya que son metodologías fácilmente aplicables con resultados confiables si son desarrollados de manera adecuada y adaptadas a las necesidades que necesite la empresa de manufactura.

El desarrollo vertiginoso de nuevos métodos de evaluación microbiológica más rápidos, con mayor sensibilidad y digitales cuenta con ventajas potenciales comparados con los tradicionales para el campo industrial al obtener resultados en horas y no en días, incrementando la capacidad de análisis, simplificando procedimientos técnicos que al final serán reflejados en el aumento de la productividad sin dejar de lado la conformidad microbiológica de los productos cosméticos.



VI

CONCLUSIONES

- ♦ La evaluación microbiológica de los productos cosméticos contribuye a la inocuidad y calidad que establece la normatividad nacional reduciendo el riesgo de daño al consumidor.
- ♦ Existen límites microbiológicos para los productos cosméticos que pueden evaluarse a través de métodos tradicionales adecuados a los lineamientos nacionales e internacionales.
- ♦ El desarrollo y aplicación de nuevos métodos de evaluación microbiológica contribuye a asegurar la calidad de los cosméticos de manera más rápida, precisa y simple aumentando la productividad, capacidad de análisis y tiempo de trabajo en comparación a los métodos tradicionales.
- ♦ La evaluación microbiológica de los productos cosméticos debe establecerse para asegurar la conformidad microbiológica en materias primas, procesos, personal y componentes que se vean involucrados la manufactura.



VII

BIBLIOGRAFÍA

1. **De Garcillan López-Rua, Mencía**; Marketing y Cosmética 2ª Ed. Madrid España. 2007. Capitulo1.
2. **Bernárdez, Zapata Telma**. CANIPEC: La Industria Cosmética en México Oportunidades en los Mercados Externos. Bancomext. Junio 2005.
3. Cámara nacional de la industria de perfumería y cosmética. **CANIPEC. Memoria estadística (2008)**.
4. **Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (CE) No.1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo**, sobre los productos cosméticos. Capitulo 1, artículo 2, L 342/6; 30 de Noviembre de 2009.
5. **Ley General de Salud**: última Reforma, DOF 20-08-2009.
6. **Jasnow, S.B. and Smith, J.L.** 1975. Microwave sanitization of color additives used in cosmetics feasibility. *Applied Microbiology*, 205-211.
7. "Handling, Storage and Analysis of Raw Materials," **CTFA Quality Assurance Guidelines**, The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Washington, D.C. 20036; December 1992.
8. **Nasser, L.A.** 2008. Fungal Profiles Isolated from Open and Used Cosmetic Products Collected from Different Localities in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 15 (1) 121-128.
9. **Fujita, Y., H. Shibayama, Y. Suzuki, S. Karita, and S. Takamatsu.** 2005. Rapid and accurate identification of microorganisms containing homology. *International Journal of Cosmetic Science*, 27: 6.



10. **Perry, B. 2001**, Cosmetic microbiology, *Microbiology Today*, 28: 185-187.
11. **Berdick, M.** 1973. The regulation of color additives in the Unites States. *CTFA Cosmet. J.* 5:27.
12. **Balsam, Ms., and Barnett,G.** 1972. *Cosmetic Science and Technology.*, 7 ed., Interscience Publisher, pp. 1034-1052.
13. **Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos /** Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. I. Series Temáticas II. Cosméticos.1a ed. Brasilia: ANVISA, 2004.52p (Serie Calidad en Cosméticos; v. 1) págs. 14,17-18.
14. Norma Oficial Mexicana **NOM-141-SSA1-1995**, Bienes y Servicios. Etiquetado para productos de perfumería y belleza preenvasados.
15. **Maren, L. Van der;** Líneas directrices de buenas prácticas de producción de productos cosméticos: traducción comentada del documento “Lignes directrices de bonnes pratiques de production des produits cosmétiques (BPPC)” publicadas por el Consejo de Europa en 1995. Generalitat de Catalunya. Departamento de Salud. Ed. Dirección General de Recursos Sanitarios. Primera edición: Barcelona, 2008.págs 64-65.
16. **Martin, M.C., M. Chivot, G. Peyrefitte.** 1997. *Dermocosmética y Estética, cosmetología.* Vol. 3, ed. Masson, pp. 57.
17. **Morpeth F.F.** 1995. *Preservation of surfactant formulations.* Blackie Academic & Professional; 147-84.
18. **Wilkinson, J.B., R.J. Moore.** 1990. *Cosmetología de Harry.* Madrid: Díaz de Santos; 747-81.
19. **Orth DS, J.J. Kabara.** 1998. Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs. *Cosm & Toil*;113(4):51-8.
20. **Schülke and Mayr.** 1993. The toxicology and tolerance of the cosmetic preservative. Euxyl K135 (1-6) Reg. No. DES-15000003).
21. **Yablonski J.I., S.E. Mancuso.** 2002. Preservation of «atypical» cosmetic product systems. *Cosm & Toil*;117(4):31.
22. **Orus P., S. Leranoz.,** 2005. *International Microbiology., MICROBIOL. INT.* ISSN 1139-6709. Madrid; 8(2).



-
23. Norma Oficial Mexicana **NOM-089-SSA1-1994**. Bienes y Servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza
 24. **MERCOSUR, GMC. RES N° 66**. 1996. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura para productos cosméticos.
 - URL: <http://www.anmat.gov.ar/Mercosur/cosmeticos/resolucionGMC>
 25. **Ley Federal de Protección al Consumidor** (última Reforma, DOF 10-06-2009)
 26. **Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios**. (DIARIO OFICIAL, Lunes 9 de agosto de 1999).
 27. **Reglamento de la Ley Federal para la Protección del Consumidor** (DIARIO OFICIAL, Jueves 3 de agosto de 2006).
 28. **Grigorova R. and J.R. Norris** "Methods in Microbiology" Vol. 22 Ed. Academic Press. 1990. Capitulo 1.
 29. **Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados**. Instituto Nacional de Ecología, 2006, 180 pp.
 30. Norma Oficial Mexicana **NOM-092-SSA1-1994**, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa
 31. **Hedén, Carl-Göran and Illéni Tiber** "New Approaches to the identification of microorganisms" John Wiley & Sons, Inc. 1975 Chapter 5.
 32. **Tempelaars C.** "The use of conductance microbiology in the cosmetics and toiletries industry. Cosmetic and Toiletries Manufacture Word Wide.
 33. **Ludovic P.**"A new rapid analysis system for complete Microbial Quality Control in the cosmetic industry." SÖFW-Journal, 126.Jahrgang 6-2000.