

302827

20

27



**UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.**

**ESCUELA DE QUIMICA**  
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**CALIDAD MICROBIOLOGICA DE  
LOS COSMETICOS ELABORADOS  
EN UNA PLANTA PILOTO**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
**MYRIAM MARTINEZ ALARCON**

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**El trabajo se realizó en:**

**La Planta Piloto de Tecnología Farmacéutica**

**Facultad de Química, UNAM**

**Bajo la dirección de:**

**Q. Lilia Vierna García**

A mis padres, MARISELA Y JORGE, por el amor,  
su confianza, ayuda, apoyo y sabios consejos  
que me han brindado siempre.

A mis hermanos, JORGE, MARISELA y GABRIELA,  
por su cariño, ayuda y apoyo. Por todos los  
momentos que hemos vivido juntos.

Los ideales son como las estrellas:  
nunca las alcanzamos,  
pero al igual que los marinos en alta mar,  
trazamos nuestro camino siguiéndolos.

A mis amigas por los momentos inolvidables que pasamos.

La verdadera amistad es una planta  
que crece despaciosamente, y debe  
resistir los azotes de la adversidad  
para poder dar buenos frutos.

A mis maestros por los conocimientos que me brindaron  
para mi vida profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Q. Lilia Vierna García, por el apoyo brindado durante la proposición y desarrollo del proyecto.
- Al I.Q. Joaquín Pérez Ruelas, por las facilidades otorgadas para el uso de las instalaciones de la Planta Piloto.

## **INDICE**

<b>Capítulo I</b>	<b>INTRODUCCION</b>	
1.1	Planteamiento del problema.....	1
1.2	Objetivo General.....	3
1.2.1	Objetivos específicos.....	4
<b>Capítulo II</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	
2.1	Historia de los Cosméticos.....	5
2.2	Cosméticos.....	5
2.2.1	Cremas.....	6
2.2.2	Geles.....	8
2.2.3	Lociones.....	9
2.2.4	Shampoos.....	10
2.2.5	Acondicionadores.....	11
2.3	Control Microbiológico.....	11
2.3.1	Tipos y fuentes de contaminación.....	15
2.3.2	Consideraciones.....	16
2.3.3	Métodos.....	16
2.4	Norma de la Ley General de Salud.....	18
<b>Capítulo III</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	
3.1	Diagrama general.....	20
3.2	Material, reactivos y equipo.....	21
3.2.1	Material biológico.....	21
3.2.2	Material de laboratorio.....	21
3.2.3	Reactivos.....	21
3.2.4	Medios de cultivo.....	22
3.2.5	Equipo.....	22
3.3	Metodología.....	22
3.3.1	Cuenta total de hongos, levaduras y mesofílicos aerobios.....	22
3.3.1.1	Toma de la muestra.....	22
3.3.1.2	Preparación preliminar de la muestra.....	23
3.3.1.3	Procedimiento.....	24
3.3.2	Prueba definitiva para la cuenta total de mesofílicos aerobios, hongos y levaduras....	24
3.3.2.1	Preparación preliminar de la muestra.....	24
3.3.2.2	Procedimiento.....	25
3.3.2.3	Interpretación de resultados.....	26
3.3.3	Identificación de patógenos.....	26
3.3.3.1	Procedimiento.....	26
3.3.4	Tinción de Gram.....	27
3.3.4.1	Procedimiento.....	27
3.3.4.2	Interpretación de resultados.....	28
3.3.5	Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> ....	28
3.3.5.1	Prueba de catalasa.....	28
3.3.5.2	Prueba de coagulasa.....	29

3.3.6	Identificación de <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	29
3.3.6.1	Desarrollo de pigmentos.....	29
3.3.6.2	Prueba de oxidasa.....	30
3.3.7	Identificación de <i>Salmonella sp.</i> .....	30
3.3.8	Identificación de <i>Escherichia coli</i> .....	31

**Capítulo IV      RESULTADOS Y DISCUSION**

4.1	Resultados.....	34
4.1.1	Cuenta total de hongos y levaduras.....	34
4.1.2	Cuenta total de mesofílicos aerobios.....	34
4.1.3	Identificación de patógenos.....	35
4.2	Discusión.....	35

**Capítulo V      CONCLUSIONES..... 38**

**BIBLIOGRAFIA..... 39**

- APENDICE A: Limpieza y sanitización del área de trabajo
- APENDICE B: Preparación de los medios de cultivo

**CAPITULO I**

## ***INTRODUCCION***

### **1.1 Planteamiento del problema**

En 1971, Carl W. Bruch insistió en que se llevara a cabo un control microbiológico en la Industria Cosmética, indicando que un producto de buena calidad microbiológica debería estar libre de microorganismos patógenos como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella*. (1)

La presencia de microorganismos en grandes cantidades en los preparados cosméticos provocan el deterioro del producto y pueden causar serios daños a la piel o cuero cabelludo, dependiendo del producto que se este aplicando.

Por otra parte, las condiciones del medio ambiente se han vuelto cada vez más agresivas y esto contribuye a potencializar los efectos negativos de dichos productos sobre el organismo humano.

Los microorganismos que se encuentran presentes en los productos pueden provocar: enturbiamiento, rompimiento de emulsiones, cambios de color, olor, pH, alteraciones en la viscosidad, formación de gas, etc.; o bien manifestar crecimiento visible de hongos o mucosidades, que dan mal aspecto y deterioran la calidad del producto. Esto provoca que la demanda del producto en el mercado baje y que el prestigio de la firma se vea afectado.

Además, la presencia de contaminantes microbianos en los productos pueden provocar irritación, sensibilización alérgica e infecciones, que ponen en riesgo la salud de los usuarios. (2)

Diversas preparaciones cosméticas han sido responsables de incidentes como: dermatitis en diferentes partes del cuerpo, septicemias en hospitales, ó úlceras oculares debidas a preparaciones contaminadas por *Pseudomona aeruginosa*.

La contaminación microbiológica de los preparados cosméticos también tiene implicaciones financieras, ya que puede generar cambios en las propiedades organolépticas y fisicoquímicas del producto, que hacen imposible su colocación en el mercado con pérdida neta para el productor.

Debido a lo anterior, las empresas extranjeras que producen cosméticos en nuestro país han establecido normas y procedimientos de control de calidad, que les permiten asegurar la calidad de sus productos y sobre todo mantener la preferencia de los consumidores, ante una competencia cada vez más agresiva. Sin embargo, las normas que establecen para su control interno están basadas en las normas publicadas o desarrolladas en los países de origen de dichas empresas y argumentan que estas normas son superiores a las normas mexicanas.

Adicionalmente, las normas extranjeras se publicaron desde hace más de dos décadas (tal es el caso de Francia, que publicó su norma en 1973). Así mismo, las normas extranjeras son más estrictas en algunos productos; por ejemplo, la norma de Gran Bretaña es más estricta en los productos de aplicación en el área ocular y los productos para bebés.

A pesar de que la norma es de aplicación obligatoria para

todas las empresas productoras de cosméticos, algunas empresas mexicanas no llevan un control microbiológico.

Debido a lo antes expuesto y tomando en cuenta que no existe en México una publicación especializada para regular a los productos cosméticos, como lo es la Farmacopea para los productos farmacéuticos y considerando que la Facultad de Química fue una de las promotoras de la norma mexicana, el objetivo básico de este trabajo es el evaluar la calidad microbiológica de los cosméticos elaborados en la planta piloto de la Facultad de Química y despertar el interés de los profesores de química y en particular de los químicos farmacobiólogos para que promuevan en las empresas de cosméticos la conciencia de calidad microbiológica y cumplan con la norma oficial.

Por otra parte, uno de los aspectos más importantes para el cumplimiento y aseguramiento de la calidad de los productos, es lo relativo a los sistemas de control de calidad que se implanten en las fábricas y laboratorios que producen cosméticos, así como los procedimientos y normas establecidas para la realización de las diferentes determinaciones.

### **1.2 Objetivo General**

**Evaluar la calidad microbiológica de los cosméticos de uso común, elaborados a nivel de planta piloto.**

### 1.2.1 Objetivos específicos

A) Comparar los valores obtenidos con las normas establecidas por la Secretaría de Salud para dichos productos.

Aplicando la metodología descrita por la Secretaría de Salud para:

- Determinar cuenta microbiana en cremas, geles, lociones, shampoos y acondicionadores.

- Determinar la presencia de microorganismos patógenos en los mismos productos.

B) Que los alumnos de microbiología aprendan a analizar en forma correcta los productos que se elaboran en la planta piloto, estableciendo procedimientos y estándares, para que los productos tengan una aplicación práctica y sobre todo sin riesgos.

C) Que los profesores y laboratoristas de los centros de educación superior desarrollen una auténtica cultura de control de calidad.

**CAPITULO II**

## **ANTECEDENTES**

### **2.1 Historia de los Cosméticos**

La historia de los cosméticos data de fechas muy antiguas, la mayoría de datos históricos datan de la época de los egipcios, pero arqueólogos y antropólogos han comprobado que en la India, Oriente y en el hemisferio Occidental, civilizaciones contemporáneas a la egipcia emplearon sustancias y prácticas sorprendentemente similares. (28)

Es posible que los cosméticos nacieran en Oriente, pero fueron los egipcios quienes dominaron mejor su aplicación. Se conocen desde hace 5000 años antes de nuestra era.

Los griegos y los romanos fueron los herederos directos de las costumbres de los egipcios, difundiéndose por toda Europa.

Inicialmente los cosméticos se utilizaron para limpiar la piel, después para cubrir imperfecciones y embellecer.

El descubrimiento de América, lleva innovaciones a España, que hasta entonces eran desconocidas por los europeos.

En el siglo XIX, la Revolución Industrial hizo que los cosméticos estuvieran al alcance de las mayorías.

Hoy la Industria Cosmética es una de las más desarrolladas. (5)

### **2.2 Cosméticos**

La palabra cosmético deriva de la voz griega "Kosmein" que significa adornar y "Kosmetikos" que significa el arte de

adornar. (24)

La definición de los cosméticos ha evolucionado con el avance de la civilización y el gran desarrollo alcanzado por los Químicos Cosmetólogos, conformando la siguiente definición: Son sustancias destinadas a ser aplicadas en cualquier forma, frotadas, vertidas, rociadas, etc., con el objeto de limpiar, hermosear, promoviendo atractivamente la belleza o cambiando la apariencia. (17)

El mercado aplica este nombre a los medios empleados para conservar y realzar la belleza física, o que borran o enmascaran sus defectos.

Los cosméticos se aplican a la superficie de la piel, al pelo, a las uñas, a la boca, a los dientes y a los ojos (pestañas): por tanto, pueden distinguirse cosméticos para la piel, para el pelo, para la boca y para los ojos. Mediante ellos se trata de limpiar los órganos antes mencionados, de darles flexibilidad, conservar o sustituir su color natural o su aspecto juvenil, comunicarles un aroma grato o destruir su desagradable olor. (20)

#### 2.2.1 Cremas

La forma cosmética de crema es una de las más importantes por la multiplicidad de usos y la gran difusión que tiene.

Son múltiples las fórmulas que de ella derivan y las aplicaciones van desde la limpieza de los dientes, hasta las más sofisticadas cremas de tratamiento.

Las cremas son sistemas de emulsiones semisólidas, con apariencia opaca. Su consistencia depende de si son: agua en aceite

(Ag/Ac) o aceite en agua (Ac/Ag).

Una emulsión es un sistema que consta, por lo menos, de dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales se encuentra disperso en el otro, en forma de gotitas. La estabilización de estos sistemas se logran mediante la adición de ciertas sustancias que constituyen la fase emulgente o emulsificadora.

Las propiedades más importantes de una emulsión son:

- Apariencia
- Sensación
- Olor

Las propiedades de aplicación dependen del tipo de producto y de su función.

Las emulsiones pueden pertenecer a cualquiera de los cuatro tipos siguientes:

- Agua en aceite
- Aceite en agua
- Agua en aceite en agua
- Aceite en agua en aceite

#### **Crema para las manos**

Se emplean para restituir las características normales de la piel, luego del baño o del trabajo con detergentes u otros elementos que alteran el equilibrio natural.

Una buena preparación debe suavizar, extendiéndose fácil y rápidamente, sin dejar una sensación grasosa.

Es importante que el aroma sea agradable, pero sin interferir

con el perfume utilizado por el consumidor.

### 2.2.2 Geles

Son sistemas semisólidos en donde la fase líquida se encuentra dentro de una matriz polimérica tridimensional. Si el sistema es muy rico en la fase líquida, se suele llamar jalea, por el contrario si predomina la fase sólida, se llama gel seco o xerogel. Los polímeros utilizados para preparar geles cosméticos son: Gomas naturales como el tragacanto, la pectina, el agar y el ácido algínico; materiales sintéticos como el carbopol (que es un polímero de vinil sintético) o semisintéticos como metilcelulosa y sus derivados.

Las preparaciones semisólidas son aplicadas en la piel, con funciones emolientes y/o protectoras.

Los más utilizados son los geles de emulsión y los hidrogeles.

#### Geles de emulsión

Son geles lipofílicos ó hidrofílicos con emulsionantes.

#### *Geles lipofílicos con emulsionantes*

Los geles lipofílicos secos contienen emulsionantes que forman con agua sistemas de emulsión Ag/Ac, son indicados como bases de absorción.

Poseen una consistencia elástica y una buena capacidad para untarse. Dificultan muy poco la respiración cutánea, penetran bien en la piel.

#### *Geles hidrofílicos con emulsionantes*

Son bases de emulsión hidrofílica que forman con agua sistemas

de emulsión Ac/Ag.

Como el agua forma la fase externa, son lavables y diluibles con agua. Tienen un efecto refrescante como consecuencia de la evaporación de la fase externa en la superficie de la piel, posee buena extensibilidad sobre la piel y no obstaculiza la respiración cutánea.

#### **Hidrogeles**

Son geles sin grasa, hidratados; se obtienen por hinchamiento de sustancias orgánicas macromoleculares o compuestos inorgánicos, la fase líquida es el agua. La cantidad de agua utilizada determina las propiedades reológicas del preparado.

Con cantidades crecientes de agua pasan del estado elástico al plástico y finalmente al líquido. Los hidrogeles dejan al secarse una película elástica, no pegajosa que se adhiere bien a la piel.

Para la elevación de la elasticidad se adhieren ablandadores como: glicerol, sorbitol, etilenglicol, 1,2-propilenglicol, en concentraciones del 10-20 %.

#### **2.2.3 Lociones**

Las soluciones son todos aquellos cosméticos resultantes de la disolución de una o más sustancias en el seno de un solvente o de una mezcla de solventes.

Las preparaciones cosméticas llamadas lociones contienen sustancias antisépticas o germicidas útiles en el tratamiento de afecciones cutáneas, o sustancias refrescantes y/o sedantes, apropiadas para las pieles irritadas. (12)

Las lociones tonificantes son soluciones hidroalcohólicas con perfume floral (azahar, rosa, etc.) que producen una acción refrescante por la evaporación del vehículo, de astringencia suave en virtud de los agentes activos que contienen.

Actúan completando la limpieza del cutis y su antiseptia. Siempre se aplican después de las cremas de limpieza.(27)

#### **2.2.4 Shampoos**

Los shampoos son productos empleados para la detergencia del cuero cabelludo y cabellos.

Con su aplicación el usuario busca que su cabello quede limpio, lustroso, sedoso, no excesivamente desengrasado, ni electrizado.

Los shampoos pueden presentarse en solución, en gel o en crema.

##### **- Shampoos en solución**

Son simples soluciones acuosas o hidroalcohólicas, formuladas en base a los grupos de sustancias tensoactivas (aniónicas, catiónicas, no iónicas y anfotéricas), perfumadas y coloreadas.

Se dividen en: convencionales y específicos.

##### **- Shampoos en gel**

Son los geles acuosos más importantes, elaborados a base de una mezcla de tensoactivos.

##### **- Shampoos en crema**

Son emulsiones generalmente del tipo Ac/Ag, que resultan más atractivas cuando presentan un brillo nacarado.

En la actualidad ya no tienen mucha aplicación, ya que el público prefiere los shampoos en solución o en gel.

#### 2.2.5 Acondicionadores

Los acondicionadores son preparados que ayudan a mantener el cabello en su lugar, dan lustre y apariencia natural. (27)

Los acondicionadores son emulsiones. (Ver apartado 2.2.1)

#### 2.3 Control Microbiológico

En 1955 Vaughan reportó un gran número de infecciones en la cornea por *Pseudomona aeruginosa*, debido al uso de productos contaminados.

En 1967 en el Hospital de Worcester, Massachusetts se reportó un brote de septicemia que fue atribuida a una crema para las manos contaminada, la cual se utilizaba en la sección de terapia intensiva.

En 1972 la FDA, reportó contaminaciones bacterianas en lociones para el cuerpo y máscaras para pestañas, dicha contaminación se debía principalmente a la presencia de *P. aeruginosa* y se señalaba que si estos productos se aplicaban en cortaduras, quemaduras, piel irritada o membranas mucosas, causarían infecciones inflamatorias, irritación y en el último de los casos ceguera. (26)

Si tenemos en cuenta que los productos cosméticos contienen sustancias preservativas que inhiben el crecimiento de microorganismos provenientes de la materia prima, del agua, del

equipo, del ambiente y de los que pudieran llegar al producto durante su uso, debemos pensar que cuando llegan al usuario se encuentran libres de microorganismos. Sin embargo, la experiencia nos demuestra que ésto no sucede, como lo certifican los numerosos trabajos realizados a nivel mundial que ponen en evidencia la frecuente contaminación de los productos. (1,3,8,9,22)

En los últimos años se ha manifestado una seria preocupación por parte de productores, investigadores y legisladores, debido a los riesgos y peligros potenciales derivados de la contaminación microbiológica de los cosméticos y productos de tocador.

Los riesgos y peligros se analizan desde dos puntos de vista:

- a) En lo que atañe al consumidor del producto, cuya salud puede verse afectada, y
- b) En lo que se refiere a la estabilidad del preparado, que puede verse afectada, si la calidad y la cantidad de microorganismos se halla por encima de la tolerancia.

Los fabricantes de cosméticos y productos de tocador tienen la obligación de no comercializar substancias perjudiciales para el consumidor. Tales substancias aplicadas a la piel, pueden provocar graves efectos dañinos, siendo los más frecuentes la irritación y la sensibilización alérgica.

Los irritantes son substancias o preparaciones no corrosivas que por contacto inmediato, prolongado o repetido con la piel o mucosas, causan la inflamación.

Los síntomas clínicos de la inflamación son: enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor. No todas las lesiones presentan éstas características.

Las irritaciones leves, provocadas por el uso continuado de algunos productos cosméticos, originan enrojecimiento y picor leve, con hinchazón o calor inapreciables.

Muchas de las sustancias utilizadas en la fabricación son susceptibles de degradación biológica por microorganismos.

Debe recordarse que un producto puede contener una población bacteriana en crecimiento, incluso a pesar de que no existan pruebas visibles de ello.

La contaminación microbiana puede manifestarse por el crecimiento visible del contaminante. Con frecuencia, los mohos y los hongos pueden detectarse cuando crecen en la superficie del producto o en las paredes del envase. Los microorganismos también pueden ser visibles en preparados líquidos, como turbidez o sedimentación. Los cambios de color pueden producirse como resultado de alteraciones en el pH, o debido a la producción de pigmentos por los microorganismos contaminantes.

Los procesos metabólicos de algunos microorganismos originan la formación de gas que puede observarse como burbujas o espuma en preparados líquidos. El deterioro del producto se manifiesta frecuentemente por la producción de olores. Además los microorganismos pueden ocasionar ruptura de emulsiones o pérdida de

textura en preparados tópicos.

Determinado producto colocado en contacto íntimo con la piel, especialmente si está herida o lesionada, puede originar una infección.

Se ha encontrado que las especies de *Pseudomonas* han desarrollado resistencias totales a los parabenos y al cloruro de benzalconio, utilizados como conservadores en productos que contienen detergentes. En ambos casos se halló que las *Pseudomonas* metabolizaron el detergente.

Se han realizado varios estudios independientes sobre el tipo y amplitud de la contaminación en cosméticos usados y no usados.

Los microorganismos gramnegativos, en particular las *Pseudomonas*, parecen ser los microorganismos más frecuentemente aislados en cosméticos no usados y estafilococos, hongos y levaduras en los usados.

El control de calidad comienza antes de adquirir cualquier substancia, continua a lo largo del proceso de fabricación, acondicionamiento y distribución, y no únicamente en el producto terminado al final del proceso de fabricación.

Los productos de elevada calidad microbiológica no se elaboran por casualidad, se diseñan así desde las primeras fases de la fabricación.

El ensayo del producto terminado es sólo una medida de las buenas prácticas de manufactura.

El análisis microbiológico de las materias primas y del

producto terminado es indispensable en el control de calidad, para asegurar que los productos sean idénticos de principio a fin y que no hay una variación importante en cuanto a la estabilidad, seguridad y eficacia. El control debe extenderse a los procesos de fabricación, en los que debe evitarse cualquier posibilidad de contaminación y conducirse dentro de rigurosas y estrictas normas de higiene.

### 2.3.1 Tipos y fuentes de contaminación

Existen dos tipos de contaminación:

- a) Primaria
- b) Secundaria

a) La contaminación primaria es aquella que se encuentra de origen en la materia prima.

b) La contaminación secundaria es la que se introduce durante el manejo inadecuado de la materia prima o del producto terminado.

Los microorganismos que pueden contaminar los materiales y los productos pueden hallarse entre los siguientes: cocos grampositivos (estafilococos, estreptococos y micrococos), bacilos grampositivos del género *Bacillus* y a veces *Corynebacterium*, bacilos gramnegativos del tipo enterobacterias y pseudomonas. Entre los hongos y levaduras se hallan los géneros: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Candida*, *Torula*, etc.

Esta lista no es limitada y la presencia de un determinado microorganismo depende del origen de la contaminación.

La contaminación se puede originar de:

- Materias primas
- Medio ambiente
- Equipo
- Material de envasado, y
- Personal

### 2.3.2 Consideraciones

En el control microbiológico se consideran los siguientes puntos:

- I El muestreo
- II Preparación previa de los diferentes tipos de productos a controlar
- III Preparación de los distintos medios de cultivo
- IV Ensayo previo para controlar un producto del que se ignora si contiene o no conservadores
- V Técnica para determinar el número de microorganismos aerobios totales
- VI Técnica para determinar el número de hongos y levaduras
- VII Identificación de microorganismos patógenos

### 2.3.3 Métodos

Los métodos utilizados para el análisis de los productos son los siguientes:

- Cuenta de colonias (UFC)
- Prueba de reto, para la estimación de la actividad del conservador

El primer paso consiste en proporcionar una serie de

condiciones bajo las cuales cada unidad microbiológica viva, presente en el material, pueda desarrollar una colonia discreta pero visible.

Para tener un número de colonias fáciles de contar, con frecuencia se requiere diluir el material en ensayo con un diluyente que no afecte a los microorganismos. Una alícuota de la dilución resultante se distribuye sobre un medio y se incuba.

Conforme al número de colonias que se desarrollen, y dado que se conoce la dilución efectuada y el volumen de la alícuota, puede calcularse la cantidad de microorganismos por unidad de peso o de volumen del material en ensayo.

Muchos de los materiales que ingresan al laboratorio de control microbiológico se hallan protegidos por conservadores, por lo tanto, antes de efectuar la operación para la cuenta de microorganismos, debe neutralizarse el conservador por incorporación de un agente adecuado.

Hay varios métodos para la siembra a fin de facilitar el conteo.

#### 1.- Método de dispersión en placa

a) Una cantidad alícuota del material diluido se distribuye sobre la superficie del medio contenido en una placa, para que se impregne el material de modo que los microorganismos queden en la superficie. Luego se invierte la placa y se incuba.

El material puede distribuirse uniformemente utilizando un esparcidor manual de vidrio, o simplemente inclinando con cuidado

la placa de manera que el líquido se distribuya uniformemente sobre la totalidad de la placa.

b) El material diluido se incorpora directamente al medio nutritivo cuando éste se halla todavía en estado líquido.

Una alícuota de la dilución se coloca en una caja petri estéril y se agrega el agar fundido a una temperatura de 45 °C. Se mezcla por rotación suave (5 a 6 veces) primero en el sentido de las manecillas del reloj y después en sentido contrario. Cuando el contenido solidifica, se invierte la placa y se incuba.

c) El material en ensayo se filtra a través de una membrana (0.45 micras) que luego se coloca directamente sobre el agar. Se invierte la placa y se incuba.

#### 2.- Método del número más probable (N.M.P.)

Está basado en el supuesto de que las bacterias normalmente se encuentran distribuidas en forma estadística en un medio líquido. Las diversas muestras de igual volumen tomadas de la misma fuente de ensayo, deben dar en promedio el mismo número de microorganismos. Se acepta una razonable desviación de la media aritmética.

#### 2.4 Norma de la Ley General de Salud

Los límites microbiológicos permitidos para los productos terminados son los siguientes:

##### I Microorganismos aerobios:

No más de 1000 colonias/g o por ml de producto

No más de 500 colonias/g o ml en los productos para niños  
y para aplicación en el área de los ojos

II Hongos y levaduras:

No más de 100 colonias/g o ml de producto

III Ausencia de *Escherichia coli*

IV Ausencia de *Salmonella sp.*

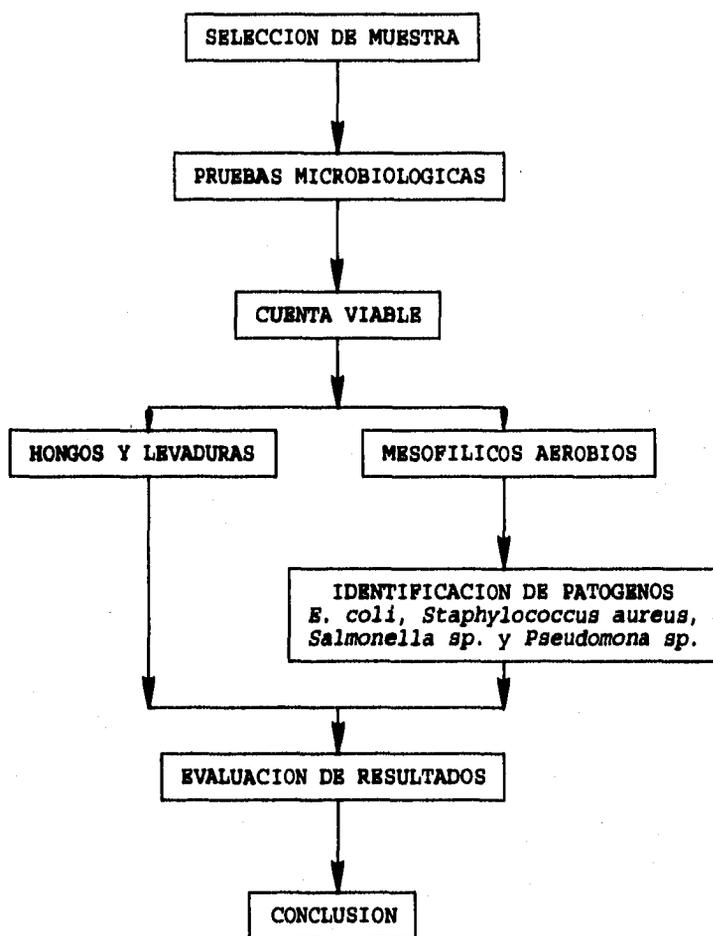
V Ausencia de *Pseudomona sp.*

VI Ausencia de *Staphylococcus aureus.*

**CAPITULO III**

## PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Diagrama general



### 3.2 Material, reactivos y equipo

#### 3.2.1 Material biológico

Plasma de conejo o cobayo

#### 3.2.2 Material de laboratorio

Matraces Erlenmeyer de 2000, 1000, 500, 200 y 100 ml

Pipetas serológicas en 1/10 de 1, 2, 5 y 10 ml

Vasos de precipitados de 80 y 500 ml

Probetas de 100, 500 y 1000 ml

Embudos de vidrio

Frascos gotero

Cajas de Petri 20 x 100 mm y 15 x 100 mm

Pipetas Pasteur

Tubos de ensayo 16 x 150 mm

Botellas de 100 ml para dilución con tapón de rosca

Termómetro graduado de -10 a 200 °C

Portaobjetos

Papel parafilm

Marcador

Masking tape

Mechero

Gasa

Algodón

Membrana de 0.45 micras

Porta filtro

#### 3.2.3 Reactivos

Aceite mineral

Acetona

Acido acético glacial

Acido clorhídrico

Alcohol amílico o butílico

Cloruro de sodio

Cristal violeta

Diclorhidrato de N-N-dimetil p-fenilendiamina

Etol absoluto

Fosfato monobásico de potasio

Glicerina

Hidróxido de sodio

Hipoclorito de sodio

Peróxido de hidrógeno

Safranina O

Telurito de potasio

Tween 80

Yodo

Yoduro de potasio

### 3.2.4 Medios de cultivo

Agar Cetrimida  
Agar Rosina Azul de Metileno (EMB)  
Agar Extracto de Malta  
Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI)  
Agar Letthen Modificado  
Agar MacConkey  
Agar Pseudomona F (Flo)  
Agar Pseudomona P (Tech)  
Agar Papa Dextrosa  
Agar Sal y Manitol  
Agar Sulfito y Bismuto  
Agar Verde Brillante  
Agar Vogel Johnson  
Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD)  
Base de Caldo Tetracionato  
Caldo Selenito y Cistina  
Caldo Dextrosa Sabouraud  
Caldo Infusión de Cerebro y Corazón  
Caldo Letthen Modificado

### 3.2.5 Equipo

Estufa a  $35 \pm 2$  °C  
Estufa a  $30 \pm 2$  °C  
Refrigerador  
Balanzas analítica y granataria  
Potenciómetro  
Autoclave  
Horno para esterilizar  
Espátulas  
Microscopio  
Baño maría  
Cuenta colonias  
Asa y porta asa  
Pinzas y tijeras

## 3.3 Metodología

### 3.3.1 Cuenta total de hongos, levaduras y mesofílicos aerobios

#### 3.3.1.1 Toma de la muestra

Analizar la muestra tan pronto como sea posible. Si es necesario almacenar, debe hacerse a la temperatura ambiente.

No incubar, refrigerar o congelar las muestras antes o después de su análisis.

Inspeccionar las muestras cuidadosamente antes de abrirlas y anotar cualquier irregularidad del contenedor de dichas muestras.

Desinfectar la superficie del contenedor con un algodón estéril impregnado con cualquiera de los siguientes desinfectantes:

- Solución de etanol al 70% (v/v) y ácido clorhídrico 1% (v/v)
- Solución de etanol al 70% con 4% de yodo
- Benzal al 0.001 %

Antes de abrir y tomar la muestra, secar la superficie con gasa estéril.

Homogenizar el producto al tomar la muestra necesaria de acuerdo a su estado físico. Para líquidos, agitar el contenido del envase; para semisólidos y polvos, mezclar el contenido con una espátula estéril; para sólidos, raspar el producto con una espátula estéril y tomar una muestra representativa.

#### **3.3.1.2 Preparación preliminar de la muestra**

Para las muestras que sean miscibles en Caldo Letthen Modificado (CLM) y Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS), adicionar 1 g ó ml en 90 ml de CLM y 1 g ó ml en 90 ml de CDS en condiciones asépticas.

Para las muestras que no sean miscibles en CLM y CDS, en 2 frascos estériles debidamente etiquetados, uno para CLM y otro para CDS, adicionar 1 g ó ml de la muestra y agregar 0.5 ml de tween 80 estéril a cada uno de los frascos previamente marcados y homogenizar la muestra.

Para muestras líquidas colocar los frascos en baño maría a

45 °C hasta formar una emulsión homogénea (el tiempo de exposición en el baño no debe exceder de 15 minutos).

Posteriormente agregar a cada uno de los frascos 90 ml de CLM y 90 ml de CDS respectivamente y agitar perfectamente.

### **3.3.1.3 Procedimiento**

Incubar los medios de cultivo inoculados a  $30 \pm 2$  °C durante 7 días. Marcar los frascos que se enturbien al agregar la muestra.

Confirmar si existe crecimiento a los 2 y 7 días de incubación.

Cuando el crecimiento sea evidente o se tenga duda del desarrollo microbiano, hacer una resiembra en Agar Letthen Modificado (ALM) y en Agar Extracto de Malta (AEM), inoculando 0.5 ml del cultivo de CLM y CDS respectivamente, empleando el método de vaciado en placa.

Incubar durante 4 días a  $30 \pm 2$  °C.

Observar si hay crecimiento en los medios inoculados.

Si no hay crecimiento reportar menos de 10 UFC/ml ó g de muestra.

Si hay crecimiento, continuar con la prueba definitiva que se describe a continuación.

### **3.3.2 Prueba definitiva para la cuenta total de mesofílicos aerobios, hongos y levaduras**

#### **3.3.2.1 Preparación preliminar de la muestra**

Agregar por separado 10 ml ó g de muestra a 90 ml de medio

CLM y CDS, (dilución  $10^{-1}$ ) cuando las muestras sean miscibles en éstos.

Para las muestras que no son miscibles; en dos frascos debidamente etiquetados, uno para CLM y otro para CDS, adicionar 10 ml ó g de muestra y colocar 5 ml de tween 80 estéril a cada uno de los frascos previamente marcados.

Para muestras líquidas colocar los frascos en baño maría a  $45^{\circ}\text{C}$  hasta formar una emulsión homogénea (el tiempo de exposición en el baño no debe exceder de 15 minutos).

Posteriormente agregar a cada uno de los frascos 85 ml de CLM y 85 ml de CDS respectivamente (dilución  $10^{-1}$ ) y agitar perfectamente.

A partir de la dilución  $10^{-1}$ , realizar diluciones seriadas según el crecimiento esperado de la siguiente manera:

TUBO	DILUCION	VOLUMEN AGREGADO	CLM ó CDS
1	$10^{-2}$ ó 1:100	1 ml de dilución $10^{-1}$	9 ml
2	$10^{-3}$ ó 1:1000	1 ml de dilución $10^{-2}$	9 ml
3	$10^{-4}$ ó 1:10,000	1 ml de dilución $10^{-3}$	9 ml
4	etc.		

Para la cuenta estándar total realizar las diluciones en CLM y para la cuenta de hongos y levaduras realizar las diluciones utilizando CDS. Mezclar hasta homogenizar.

### 3.3.2.2 Procedimiento

Colocar 1 ml de cada dilución en cajas de Petri estériles previamente marcadas con la dilución, registro y fecha, agregar de 18 a 20 ml del medio de cultivo cuidando que la temperatura no sea

mayor a 45 °C, para cuenta estándar total utilizar ALM y para cuenta de hongos y levaduras emplear AEM o Agar Papa Dextrosa (APD).

Homogenizar el inóculo en el medio de cultivo, rotando la caja sembrada de izquierda a derecha, vertical y horizontalmente 6 veces en cada ocasión.

Dejar solidificar el medio de cultivo en las cajas.

Invertir las cajas e incubar a  $30 \pm 2$  °C durante 48 horas para la cuenta estándar total, a 22 °C durante 5 días para la cuenta de hongos y a 35 °C por 48 horas para la cuenta de levaduras.

#### **3.3.2.3 Interpretación de resultados**

*Cuenta total de hongos y levaduras*

Contar el número de hongos y levaduras que se encuentren.

Reportar el número de colonias por ml ó g de muestra multiplicando por el inverso de la dilución observada.

*Cuenta total de mesofílicos aerobios*

Contar las cajas en donde se encuentren de 25 a 250 UFC.

Reportar el número de UFC/ml ó g de muestra multiplicando por el inverso de la dilución observada.

#### **3.3.3 Identificación de patógenos**

##### **3.3.3.1 Procedimiento**

Incubar los tubos de la dilución 1:100 ó 1:1000 de CLM utilizados para la cuenta estándar total, durante 7 días a  $30 \pm 2$  °C.

A partir de los tubos inoculados sembrar una asada en los siguientes medios de cultivo diferenciales: Agar Rosina Azul de Metileno (EMB), Agar MacConkey (AMC), Agar Cetrimida, y Agar Vogel Johnson (AVJ). Incubar de 33 a 37 °C durante 24 horas los medios de EMB y AMC, y 48 horas el Agar Cetrimida y AVJ.

Observar las cajas inoculadas para identificación de *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa*) en los medios respectivos. (Tabla 3.1)

#### **3.3.4 Tinción de Gram**

Si se observan colonias sospechosas de los microorganismos antes mencionados, de acuerdo a la Tabla 3.1, realizar una tinción de Gram para identificar morfología microscópica.

##### **3.3.4.1 Procedimiento**

Preparar un frotis con microorganismos provenientes de un cultivo de 24-48 horas de incubación.

Aplicar calor suave al portaobjetos con la llama de un mechero o de una lámpara de alcohol de manera paulatina. El calentamiento no debe ser excesivo ni violento.

Enfriar y aplicar sobre el frotis unas gotas de solución de cristal violeta, dejar actuar un minuto.

Lavar con agua y escurrir.

Aplicar unas gotas de solución yodo-yodurada como mordente, dejar actuar un minuto.

Lavar con agua y escurrir.

Decolorar el frotis con unas gotas de la solución alcohol-acetona, durante no más de 10 segundos.

Lavar con agua y escurrir.

Aplicar unas gotas de la solución de safranina, dejar actuar un minuto.

Lavar con agua, inclinar el portaobjeto para dejar escurrir el exceso de agua y secar los bordes con papel secante.

Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

#### **3.3.4.2 Interpretación de resultados**

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

Las bacterias Gram negativas se observan teñidas de color rojo.

Comparar la morfología observada con la tinción de Gram de la Tabla 3.1.

#### **3.3.5 Identificación de *S. aureus***

En caso de encontrar cocos en racimo Gram positivos, aislar por estría cruzada en Agar Sal y Manitol, incubar a 35°C por 24-48 horas. (Tabla 3.2)

Realizar las siguientes pruebas para identificación de *S. aureus*.

##### **3.3.5.1 Prueba de catalasa**

En un portaobjetos adicionar una gota de solución de agua

oxigenada al 3% y dispersar una porción de la colonia sospechosa.

La reacción es positiva si se observan burbujas efervescentes del oxígeno desprendido.

#### **3.3.5.2 Prueba de coagulasa**

En forma aséptica colocar 0.5 ml de plasma de conejo o cobayo en el fondo de un tubo de prueba estéril.

Dispersar una porción de la colonia sospechosa y mezclar con suavidad rotando el tubo.

Colocar el tubo en un baño de agua a 37 °C por 24 horas. Observar el tubo cada 30 minutos durante las primeras 4 horas de la prueba. Si todas las pruebas son negativas a las 4 horas, observar de nuevo el tubo después de 24 horas de incubación.

La reacción se considera positiva si cualquier grado de coagulación es visible dentro del tubo. Esta prueba se observa mejor inclinando el tubo.

La presencia de *S. aureus* puede confirmarse si es necesario con otras pruebas bioquímicas.

#### **3.3.6 Identificación de *P. aeruginosa***

En caso de encontrar colonias sospechosas en el Agar Cetrimida y bacilos Gram negativos en la tinción de Gram, realizar las siguientes pruebas para la identificación de *P. aeruginosa*. (Tabla 3.3)

##### **3.3.6.1 Desarrollo de pigmentos**

Sembrar por estría cruzada en Agar Pseudomona F (Flo) y en

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Agar *Pseudomona P* (Tech), incubar a 35 °C por 24-72 horas.

Observar con luz ultravioleta las colonias desarrolladas y comparar la morfología colonial con la descrita en la Tabla 3.

#### 3.3.6.2 Prueba de oxidasa

Impregnar una tira de papel filtro en diclorohidrato de N-N-dimetil-p-fenilendiamina y colocar sobre ella una porción de la colonia sospechosa.

La prueba es positiva si se desarrolla un color que va de rosa o púrpura.

La presencia de *P. aeruginosa* puede confirmarse si es necesario con otras pruebas bioquímicas.

#### 3.3.7 Identificación de *Salmonella sp.*

En caso de que en los medios AMC o EMB se encuentren colonias sospechosas de *Salmonella*, sembrarlas en Caldo Selenito-Cistina y Caldo Tetrationato, incubar a 35 °C durante 12-24 horas.

Si se observa crecimiento en cualquiera de los medios de enriquecimiento, tomar una azada y aislar por estría cruzada en los siguientes medios: Agar Verde Brillante, Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) y Agar Sulfito y Bismuto; incubar a 35 °C por 24-48 horas.

Observar las morfologías coloniales y compararlas con las descritas en la Tabla 3.4.

Si la morfología es similar, sembrar por estría y picadura en el medio Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI), leer las

características bioquímicas y compararlas con las descritas en la Tabla 3.4.

Si las características bioquímicas son iguales reportar presencia de *Salmonella sp.*

La presencia de *Salmonella* puede confirmarse si es necesario con otras pruebas bioquímicas.

### **3.3.8 Identificación de *E. coli***

En caso de que en los medios EMB y AMC la morfología colonial observada no corresponda con la descrita en la Tabla 1, la muestra cumple los requisitos de ausencia de *E. coli*.

En caso de encontrar en los medios EMB y AMC colonias que corresponden a la morfología colonial descrita en la Tabla 3.1, reportar presencia de *E. coli*.

La presencia de *E. coli* puede confirmarse si es necesario con pruebas bioquímicas adecuadas.

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO Y TINCION DE GRAM	CARACTERISTICAS COLONIALES
Agar Rosina y Azul de Metileno (RMB)	<i>Escherichia coli</i> Bacilos negativos	Pequeñas azul-negro en la parte central, con brillo metálico verdoso a la luz reflejada
	<i>Salmonella</i> sp. Bacilos negativos	Transparentes desde incoloras hasta amarinas
Agar MacConkey (AMC)	<i>Salmonella</i> sp. Bacilos negativos	Incoloras, transparentes o amarinas
	<i>Escherichia coli</i> Bacilos negativos	Grandes, rojas o rosadas, pueden rodearse de un precipitado opaco de sales biliares
Agar Cetrinida	<i>Pseudomona aeruginosa</i> Bacilos negativos	Grandes blancas o verde azules, con luz U.V. se observan de color verdoso
Agar Vogel Johnson (AVJ)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pequeñas negras con halo amarillo

Tabla 3.1

MEDIO DE CULTIVO	CARACTERISTICAS COLONIALES	PRUEBA CATALASA	PRUEBA COAGULASA
Agar Sal y Manitol	Amarillas, rodeadas de una zona amarilla	Positiva	Positiva

Tabla 3.2 Características de *Staphylococcus aureus*

MEDIO DE CULTIVO	CARACTERISTICAS COLONIALES	PRUEBA OXIDASA
Agar Flo	Incoloras o amarillentas, con luz U.V. se observan de color amarillo	Positiva
Agar Tech	Verde azulosas, con luz U.V. se observan de color azul	Positiva

Tabla 3.3 Características de *Pseudomonas aeruginosa*

MEDIO DE CULTIVO	CARACTERISTICAS COLONIALES
Agar Verde Brillante	Pequeñas transparentes de color rosa pálido y rodeadas de un halo rojo brillante
Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)	Rojas con o sin centro negro
Agar Sulfito y Bismuto	Negras o verdes
Agar Hierro y Triple Azúcar	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS
	Superficie alcalina (roja), picadura ácida (amarilla), con o sin producción de ácido sulfhídrico (negro)

Tabla 3.4 Características de *Salmonella* sp.

**CAPITULO IV**

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

### **4.1 Resultados**

#### **4.1.1 Cuenta total de hongos y levaduras**

Norma: No más de 100 UFC/ml

PRODUCTO	HONGOS	LEVADURAS	TOTAL
Crema	100 UFC/ml	300 UFC/ml	400 UFC/ml
Gel	-	10 UFC/ml	10 UFC/ml
Loción	100 UFC/ml	100 UFC/ml	200 UFC/ml
Shampoo	30 UFC/ml	200 UFC/ml	230 UFC/ml
Acondicionador	400 UFC/ml	300 UFC/ml	700 UFC/ml

Tabla 4.1.1 Hongos y levaduras

#### **4.1.2 Cuenta total de mesofílicos aerobios**

Norma: No más de 1000 UFC/ml

PRODUCTO	MESOFILICOS AEROBIOS
Crema	400 UFC/ml
Gel	100 UFC/ml
Loción	1000 UFC/ml
Shampoo	500 UFC/ml
Acondicionador	100 UFC/ml

Tabla 4.1.2 Mesofílicos aerobios

#### 4.1.3 Identificación de microorganismos patógenos

No se identificaron ninguno de los cuatro microorganismos patógenos marcados en la norma de la Secretaría de Salud.

Se identificaron en algunos de los productos los siguientes microorganismos. (Tabla 4.1.3)

PRODUCTO	MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS
Loción	<i>Bacillus</i> y <i>Staphylococcus</i>
Shampoo	<i>Klebsiella</i> y <i>Staphylococcus</i>
Acondicionador	<i>Klebsiella</i> y <i>Staphylococcus</i>

Tabla 4.1.3

#### 4.2 Discusión

Todas las pruebas se realizaron por duplicado y aún cuando los valores obtenidos no muestran desviaciones fuera de lo normal, las condiciones de limpieza del lugar de trabajo y la verificación previa de las características de cada uno de los medios y reactivos utilizados fueron de suma importancia para garantizar la veracidad de los resultados obtenidos.

Se puede observar que de los cinco productos analizados únicamente el gel cumple en su totalidad, con las normas establecidas por la Secretaría de Salud.

Los cuatro productos restantes: crema, loción, shampoo y acondicionador no cumplen con la norma en lo concerniente a la cuenta total de hongos y levaduras; y la loción no cumple tampoco

con la norma en lo concerniente a la cuenta total de mesofílicos aerobios.

No se identificaron microorganismos patógenos como: *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Salmonella*; pero se identificaron microorganismos como: *Klebsiella* y *Staphylococcus* en el acondicionador y en el shampoo, y *Bacillus* y *Staphylococcus* en la loción.

En la cuenta total de hongos y levaduras se identificaron hongos del género *Penicillium* y *Aspergillus*, y levaduras del género *Candida* y *Rhodotorula*.

Los cosméticos analizados se elaboran para cumplir los requisitos establecidos en la asignatura de Tecnología Farmacéutica, y las pruebas que deben realizar los alumnos al producto terminado son únicamente de carácter físico como: consistencia, viscosidad, color, olor, etc., pero no se incluye el aspecto microbiológico. Por esta razón es necesario establecer una coordinación con el departamento de biología para que se lleve a cabo un trabajo integral que permita una formación más completa de los alumnos, promoviendo una verdadera conciencia de calidad.

Analizando el proceso que se lleva a cabo en la planta piloto, tomando en cuenta que no se participó en forma directa en la elaboración de los productos, y de acuerdo a la información recabada podemos decir que: las materias primas utilizadas en la elaboración de los productos, fueron analizadas y aprobadas de acuerdo a las especificaciones establecidas, por lo que la

contaminación reportada proviene principalmente del agua utilizada en la fabricación, del proceso de fabricación y del envase.

El 80% de los productos analizados se encuentran fuera de las normas establecidas, lo que confirma la necesidad de establecer procedimientos y estándares microbiológicos con el fin de:

- 1) Controlar el peligro procedente de microorganismos patógenos.
- 2) Asegurar que el producto cosmético nunca ha estado gravemente contaminado.
- 3) Asegurar una vida razonable en el almacenamiento.

**CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES**

A) De los cosméticos analizados el 80% son rechazados de acuerdo a las normas de la Secretaría de Salud. De los productos rechazados el 100% presenta un recuento de hongos y levaduras elevado y el 25% un recuento de mesofílicos aerobios elevados. No se identificaron microorganismos patógenos.

Se deben desarrollar procedimientos adecuados para eliminar la contaminación de los productos durante su elaboración.

B) Se implementó la metodología para que los alumnos realicen un análisis integral de los productos que elaboran.

Los cosméticos de alta calidad microbiológica deben ser diseñados así desde la planta piloto.

C) Se debe establecer una cultura de calidad que debe ser aplicada en todas las actividades del desarrollo profesional.

Es necesario promover la concientización del personal que trabaja en la elaboración de cosméticos, del riesgo que representa para las personas el uso de productos contaminados.

D) Finalmente, considerar que esta modesta aportación sea un catalizador que permita en el futuro cercano realizar actividades, tanto en las universidades como en los centros de investigación, bajo los mismos objetivos de calidad y excelencia que se les exigen a los productos industriales.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Anderson D., Microbiological profile of used eye cosmetics by examination of products only, Cosmetics & Perfumery, 88, Agosto 1973.
- 2.- Ashour y Hefnai H., Microbial Contamination of Cosmetics and Personal Care Items in Egypt, Cosmetic & Toiletries, 102 (12), 61-65, 1987.
- 3.- Calidad Microbiológica de Productos Cosméticos Elaborados en Chile, III Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos, Memorias II, 1977.
- 4.- Campos Echeverría T. del N. J., Implementación de la Prueba de Reto Microbiológico en una Industria Cosmética, Tesis, U.N.A.M., México, 1991.
- 5.- Curso Básico de Cosmetología, Fundación Roberto Medellín S.C., México, 1995.
- 6.- D.S. Orth y S.R. Milstein, Rational Development of Preservative Systems for Cosmetic Products, Cosmetics & Toiletries, 104 (10), 91-103, 1989.
- 7.- Dñr Alfred, TECNOLOGIA FARMACEUTICA, Editorial Acribia, España, 1981.
- 8.- Estudio Microbiológico de Cosméticos para Niños, III Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos, Memorias II, 1977.
- 9.- Evaluación de la Calidad Microbiológica de Acondicionadores para el Cabello, III Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos, Memorias II, 1977.
- 10.- FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, 5ª edición, México 1988.
- 11.- GUIA PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE MEDICAMENTOS, Monografía Técnica No. 4, Comisión Interinstitucional de Prácticas Adecuadas de Manufactura, México, 1992.
- 12.- Helman J., FARMACOTECNIA TEORIA Y PRACTICA, Compañía Editorial Continental S.A., Vol. 5 y 7, México 1981.
- 13.- Joklik W.K., Willett H.P. y Amos D.B., ZINSSER MICROBIOLOGIA, Editorial Médica Panamericana S.A., 8ª edición, Buenos Aires, 1986.

- 14.- Koneman E. W., DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO, Editorial Médica Panamericana S.A., 3ª edición, Buenos Aires, 1992.
- 15.- LEY GENERAL DE SALUD, Editorial Porrúa S.A., 5ª edición, México, 1989.
- 16.- Mac Faddin J. F., PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLINICA, Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires, 1990.
- 17.- Maisson G. de N., THE CHEMISTRY AND MANUFACTURE OF COSMETICS, D. Van Nostrand Company Inc., second edition, Vol. 1, USA, 1975.
- 18.- Maisson G. de N., THE CHEMISTRY AND MANUFACTURE OF COSMETICS, D. Van Nostrand Company Inc., second edition, Vol. 3, USA, 1975.
- 19.- MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO Y PRODUCTOS BBL, 1ª edición, Editorial Secton Dickinson de México S.A. de C.V.
- 20.- Moeller J. y Thomas H., ENCICLOPEDIA COMPLETA DE FARMACIA, Casa Editorial Calleja, Tomo V, Madrid 1976.
- 21.- Nava Susaña E. J., Orígenes y Tipos de Contaminación más Frecuentes en Cosméticos, Tesis, U.N.A.M., México, 1984.
- 22.- Numeración e Identificación de Bacterias Gram negativas en Productos Cosméticos, III Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos, Memorias II, 1977.
- 23.- Orth D.S., Microbiological Considerations in Cosmetic Formula Development and Evaluation: I Microbiological Quality of a Product, Cosmetic & Toiletries, 104 (4), 49-57, 59-64, 1989.
- 24.- Owens G. W., COSMETICS, TOILETRIES AND HEALTH CARE PRODUCTS, Noyes Data Corporation, USA, 1978.
- 25.- Parsons T., A Microbiology Primer for the Microbiology Manager, Cosmetics & Toiletries, 105 (3), 73-77, 1990.
- 26.- Platica sobre el Control Microbiológico de Cosméticos, V Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos, Memorias III, 1981.
- 27.- Quiroga M.I. y Guillo C.F., COSMETICA DERMATOLOGICA PRACTICA, Editorial El Ateneo, 4ª edición, Buenos Aires, 1986.
- 28.- Sagarin E., COSMETICS SCIENCE AND TECHNOLOGY, Interscience Publishers Inc., third edition, USA, 1966.

29.- Singer S., The Use of Preservative Neutralizers in Diluents and Plating Media, Cosmetic & Toiletries, 102 (12), 55-60, 1987.

30.- Wilkinson J.B. y Moore R.J., COSMETOLOGIA DE HARRY, Ediciones Díaz de Santos S.A., Madrid 1990.

## **APENDICE A**

### **LIMPIEZA Y SANITIZACION DEL AREA DE TRABAJO**

Los procedimientos de limpieza y sanitización son realizados con el objeto de lograr muy bajos niveles de contaminación microbiana.

Limpieza y sanitización son dos importantes procedimientos en la manufactura de cosméticos de alta calidad.

Limpieza es el proceso físico para eliminar la suciedad, polvo, grasa, productos residuales y otros contaminantes de distintas superficies.

Sanitización es el proceso usado para reducir los contaminantes microbianos remanentes en superficies limpias, a niveles mínimos.

Todas las superficies de trabajo se deberán limpiar con una solución agua/detergente mediante una esponja, y posteriormente con un sanitizante no tóxico que sanitice en cinco minutos o menos como condición ideal.

## APENDICE B

### PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

#### Agar Cetrimida

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona de Gelatina.....	20.0
Cloruro de Magnesio.....	1.4
Sulfato de Potasio.....	10.0
Agar.....	13.6
Cetrimida.....	0.3

pH final 7.2 ± 0.2

Preparación: Suspender 45.3 g del medio en un litro de agua destilada. Agregar 10 ml de glicerol. Remojar durante unos 10 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave de 118 a 121 °C durante 15 minutos.

#### Agar Eosina Azul de Metileno

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona de Gelatina.....	10.000
Lactosa.....	5.000
Sacarosa.....	5.000

Fosfato Dipotásico..... 2.000  
Eosina ..... 0.400  
Azul de Metileno..... 0.065  
Agar..... 13.500

pH final  $7.5 \pm 0.2$

Preparación: Suspender 36 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar y remojar unos 10 minutos para que se hidrate correctamente el agar. Calentar agitando con frecuencia y hervir por un minuto. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.

#### **Agar Extracto de Malta**

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Extracto de Malta..... 12.75  
Dextrina..... 2.75  
Glicerina..... 2.35  
Peptona de Gelatina..... 0.78  
Agar..... 15.00

pH final  $4.6 \pm 0.2$

Preparación: Suspender 33.6 g del medio en un litro de agua destilada. Homogenizar y remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente. Hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave de 118-121 °C (12-15 lb de presión) durante 15 minutos.

**Agar Hierro y Triple Azúcar**

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Mezcla de Peptonas.....	20.000
Cloruro de Sodio.....	5.000
Lactosa.....	10.000
Sacarosa.....	10.000
Dextrosa.....	1.000
Sulfato de Amonio Férrico.....	0.200
Rojo Fenol.....	0.025
Agar.....	13.000
Tiosulfato de Sodio.....	0.200

pH final 7.3 ± 0.2

Preparación. Suspender 59.4 g del medio en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta ebullición. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 118 °C (12 lb de presión) durante 15 minutos. Los tubos se deben enfriar en posición inclinada.

**Agar Letthen Modificado**

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona Tripticasa.....	5.0
Peptona de Caseína.....	5.0
Peptona de Carne.....	10.0

Extracto de Res.....	3.0
Extracto de Levadura.....	2.0
Dextrosa.....	1.0
Lecitina.....	1.0
Polisorbato 80.....	7.0
Bisulfito de Sodio.....	0.1
Cloruro de Sodio.....	5.0
Agar.....	20.0

Preparación: Suspender 59.1 g del medio en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente durante un minuto para que se disuelva. Esterilizar en autoclave entre 12 y 15 libras de presión (118-121 °C) por 15 minutos.

*Agar MacConkey*

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona de Gelatina.....	17.000
Mezcla de Peptonas.....	3.000
Lactosa.....	10.000
Mezcla de Sales Biliares.....	1.500
Cloruro de Sodio.....	5.000
Agar.....	13.500
Rojo Neutro.....	0.030
Cristal Violeta.....	0.001

pH final 7.1 ± 0.2

Preparación: Suspender 50 g del medio en un litro de agua destilada. Remojar bien entre 10 a 15 minutos y calentar a ebullición agitando continuamente. Hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121 °C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

*Agar Flo (para Pseudomonas F)*

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Mezcla de Peptonas.....	20.0
Fosfato Dipotásico.....	1.5
Sulfato de Magnesio.....	1.5
Agar.....	14.0

pH final 7.0 ± 0.2

Preparación: Suspender 37 g de polvo en un litro de agua destilada. Agregar 10 ml de glicerol y mezclar muy bien. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando con frecuencia y hervir un minuto. Esterilizar en autoclave entre 12 a 15 libras de presión durante 15 minutos.

*Agar Tech (para Pseudomonas P)*

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona de Gelatina.....	20.0
--------------------------	------

Cloruro de Magnesio..... 1.4  
Sulfato de Potasio..... 10.0  
Agar..... 13.6

pH final 7.2 ± 0.2

Preparación: Suspender 45 g de polvo en un litro de agua destilada. Agregar 10 ml de glicerol y mezclar muy bien. Remojar durante unos 10 minutos. Agitando continuamente calentar a ebullición por un minuto. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.

**Agar Papa Dextrosa**

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Infusión de Papa..... 200.0  
Dextrosa..... 20.0  
Agar..... 15.0

pH final 5.6 ± 0.2

Preparación: Suspender 39 g del medio en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar a 15 libras de presión durante 15 minutos.

**Agar Sal y Manitol**

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Extracto de Carne..... 1.000  
Mezcla de Peptonas..... 10.000  
Cloruro de Sodio..... 75.000  
D-Manitol..... 10.000  
Agar..... 15.000  
Rojo de Fenol..... 0.025

pH final 7.4 ± 0.2

Preparación: Suspender 111 g del medio en un litro de agua destilada y remojar unos 15 minutos. Mezclar bien y calentar a ebullición por un minuto. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 °C) durante 15 minutos.

**Agar Sulfito y Bismuto**

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Mezcla de Peptonas..... 10.000  
Extracto de Carne..... 5.000  
Dextrosa..... 5.000  
Fosfato Disódico..... 4.000  
Sulfato Ferroso..... 0.300  
Indicador de Sulfito de Bismuto..... 8.000  
Verde Brillante..... 0.025  
Agar..... 20.000

pH final 7.5 ± 0.2

Preparación: Suspender 52 g del polvo en un litro de agua

destilada. Mezclar muy bien y remojar de 10 a 15 minutos. Hervir no más de un minuto agitando continuamente. Dejar que el medio se enfrie a 45 °C sin dejar de agitarlo, vacie en cajas Petri.

**Agar Verde Brillante**

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Extracto de Levadura.....	3.00
Mezcla de Peptonas.....	10.00
Cloruro de Sodio.....	5.00
Lactosa.....	10.00
Sacarosa.....	10.00
Rojo de Fenol.....	0.08
Agar.....	20.00
Verde Brillante.....	12.50

pH final 6.9 ± 0.2

Preparación: Suspender 58 g del medio en un litro de agua destilada. Dejar remojar unos 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir por un minuto. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 °C) durante 15 minutos y distribuir en cajas Petri.

**Agar Vogel Johnson**

Fórmula aproximada en gramos por litro.

Peptona de Caseína.....	10.000
Extracto de Levadura.....	5.000
Manitol.....	10.000
Fosfato Dipotásico.....	5.000
Cloruro de Litio.....	5.000
Glicina.....	10.000
Agar.....	16.000
Rojo de Fenol.....	0.025

pH final 7.2 ± 0.2

Preparación: Suspender 61 g del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y remojar de 5 a 10 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir por un minuto. Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión (121 °C) durante 15 minutos. Enfriar a 45-50 °C y agregar 20 ml de una solución de telurito de potasio al 1%.

*Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato*

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Xilosa.....	3.50
L-Lisina.....	5.00
Lactosa.....	7.50
Sacarosa.....	7.50
Cloruro de Sodio.....	5.00
Extracto de Levadura.....	3.00

Rojo de Fenol.....	0.08
Agar.....	13.50
Desoxicolato de Sodio.....	2.50
Tiosulfato de Sodio.....	6.80
Citrato de Hierro y Amonio.....	0.80

pH final 7.4 ± 0.2

Preparación: Suspender 55 g del medio en un litro de agua destilada. Dejar remojar durante 10 a 15 minutos. Calentar con cuidado, agitando con frecuencia, hasta que el medio hierva. Una vez disuelto, enfriar rápidamente en agua o en baño maría a 50 °C y verter en cajas Petri.

**Base de Caldo Tetracionato**

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Mezcla de Peptonas.....	5.0
Sales Biliares.....	1.0
Carbonato de Calcio.....	10.0
Tiosulfato de Sodio.....	30.0

Preparación: Suspender 46 g del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar a ebullición. Dejar enfriar y envasar en tubos de ensayo. No esterilizar en autoclave. Momentos antes de usarlo agregar 0.2 ml (de 3 a 4 gotas) de una solución yodo yodurada a cada tubo.

Solución yodo yodurada: Yodo en cristales                    6 gramos

Yoduro de Potasio            5 gramos  
Agua destilada                20 gramos

Usar el medio el mismo día en que se le agrega la solución de yodo.

*Caldo Selenito y Cistina*

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Mezcla de Peptonas ..... 5.00  
Lactosa ..... 4.00  
Fosfato de Sodio ..... 10.00  
Selenito ácido de Sodio ..... 4.00  
L-Cistina ..... 0.01

pH final 7.0 ± 0.2

Preparación: Suspender 23 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar ligeramente hasta que el medio se disuelva. Envasar en tubos y esterilizar a vapor fluente durante 15 minutos. El color del medio es beige o ligeramente rosa.

*Caldo Dextrosa Sabouraud*

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona Especial No. 2 ..... 10.0  
Dextrosa ..... 20.0

Preparación: Disolver 30 g del medio en un litro de agua destilada. Distribuir y esterilizar a 121 °C (15 lb de presión) durante 15 ó 20 minutos.

*Caldo Infusión de Cerebro y Corazón*

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Infusión de Cerebro de Ternera.....	200.0
Infusión de Corazón de Res.....	250.0
Mezcla de Peptonas.....	10.0
Fosfato Disódico.....	2.5
Cloruro de Sodio.....	5.0
Dextrosa.....	2.0
Agar.....	15.0

pH final 7.4 ± 0.2

Preparación: Suspender 52 g del medio en un litro de agua destilada. Remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar a 15 libras de presión (121 °C) durante 15 minutos.

*Caldo Letthen Modificado*

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona Tripticasa.....	5.0
Peptona de Caseína.....	5.0

Peptona de Carne..... 10.0  
Extracto de Res..... 3.0  
Extracto de Levadura..... 2.0  
Dextrosa..... 1.0  
Lecitina..... 1.0  
Tween 80..... 7.0  
Bisulfito de Sodio..... 0.1

Preparación: Suspender 34.1 g del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien. Calentar ligeramente hasta lograr la disolución. Esterilizar de 12 a 15 libras de presión (118-121 °C) durante 15 minutos.