



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DENTRO DEL ÁREA DE
CONTROL DE CALIDAD EN LA INDUSTRIA COSMÉTICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

KARLA ADRIANA VÁZQUEZ AVILA

ASESOR:

DRA. MARÍA ZAIDA URBÁN MORLÁN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Análisis microbiológico dentro del área de control de calidad en la industria cosmética.

Que presenta la pasante: **Karla Adriana Vázquez Avila**

Con número de cuenta: **308332760** para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Abril de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.B.P. Martha Elena García Corrales	
VOCAL	M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles	
SECRETARIO	Dra. María Zaida Urbán Morlán	
1er. SUPLENTE	Dra. Ma. Guadalupe Nava Arzaluz	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

“La medida de quienes somos es que hacemos con lo que tenemos”

Vincent Thomas Lombardi

“Me gustaría agradecerles de todo corazón, pero para ustedes amados míos, mi corazón no tiene fondo”

A mi mamá por darme fortaleza y apoyo en todas las etapas de mi vida, este logro también es tuyo y aunque nos costó mucho trabajo por fin llego el día donde todos tus esfuerzos se ven reflejados. Gracias por enseñarme que el mundo necesita de bondad y que nunca debemos de perder la confianza. ¡Te amo mucho mami!

A Lina mi hermana gracias por estar conmigo en los mejores y peores momentos. Eres un ejemplo de lealtad, fuerza y valor. Estoy orgullosa de tener una hermana que no le teme a nada ni a nadie. ¡Orgullosamente hechas en FES-C Campo 1! Te amo tata.

A mi hermano Pavel por ser una luz en mi vida, los recuerdos más hermosos de mi niñez los tengo contigo, gracias a ti aprendí que el amor es resistente aun a la distancia más larga. ¡Te amo mi bebe!

A Yubia por no solo ser mi mejor amiga por más de 7 años, por ser mi hermana. Gracias por ser mi apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida, porque todo lo vivimos juntas desde el defender con sangre el campo hasta no llegar a nuestra foto de graduación. Gracias porque al final de todo siempre estás tú. Eres mi persona. ¡Te amo gordita!

A Carlos Alfredo, por hacerte tanto bien y demostrarme que el amor puede ser incondicional y sincero, gracias por ser mi compañero de vida, de aventuras y tristezas. Gracias por borrar la penumbra. Estoy muy orgullosa del gran hombre que tengo como pareja, futuro médico y bioquímico. Y solo espero que algún día puedas verte en la forma en la que yo te veo. ¡Te amo más allá de lo que puedo comprender!

A Clara por todo el apoyo dentro y fuera del campo, en parte a ti este día es posible. Gracias por ser mi centro infalible tantos años, por ser mi amiga y por ser un ejemplo de que

no importa tu estatura para ser gigante. ¡Te amo Clarita!

A mis compañeros y amigos de trabajo Ana Laura, Lucía y Luis Alfredo por enseñarme el trabajo en equipo. Gracias por brindarme su cariño en todo momento.

A mi cuñado Jesús Viveros por cuidar a mi familia aun cuando todo era oscuro. ¡Te quiero!

A mi Coach Cecilia Rodríguez por enseñarme con tanta dedicación, amor y empeño por 5 grandes años, gracias por enseñarme a amar este deporte y por enseñarme a enfrentar la vida con valor, gracias por siempre creer en mi incondicionalmente.

A mis compañeras del equipo más duro de vencer ¡BQD! A Mara, Diana, Jeka, Rebeca, Quetzalli, Alejandra, Daniela, Rebeca Montero, Monse, Claudia, Brenda, Adriana, Ana, Marlene, Jazz, Victoria, Fano, Sandra, Penelope, gracias por 5 quemas que son una parte de mi vida que se llama felicidad.

A mi amigo Daniel por apoyarme y aguantarme tantos años, gracias por tu amistad incondicional ¡Te quiero mucho amigo!

A mi Asesora Dra. Zaida por apoyarme y ayudarme a sacar este proyecto adelante, aun con todas las situaciones complicadas que se presentaron.

A la UNAM por darme las herramientas y valores para luchar por mi país. Por darme la oportunidad de pertenecer a una de las mejores universidades del mundo.

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	viii
OBJETIVO	ix
JUSTIFICACIÓN	ix
INTRODUCCIÓN	x
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	1
1.1 Inicios del control de calidad.....	1
1.2 Inicios de la Microbiología.....	1
1.3 Introducción de los análisis microbiológicos como parte fundamental del control de calidad en la industria.....	2
1.4 Instituciones internacionales y nacionales que rigen el cumplimiento del análisis microbiológico dentro del control de calidad.	3
1.5 Instituciones encargadas de regular el control de calidad microbiológico en la industria	4
1.5.1 Instituciones Internacionales	4
1.5.2 Instituciones Nacionales.....	5
CAPÍTULO 2. INDUSTRIA COSMÉTICA EN MÉXICO	6
2.1 Crecimiento de la industria cosmética en México	6
CAPÍTULO 3. ASPECTOS GENERALES DE LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS	7
3.1 Definición de cosméticos	7
3.2 Clasificación de cosméticos	7
CAPÍTULO 4. REQUERIMIENTOS QUE DEBE CUMPLIR EL QUÍMICO ANALISTA MICROBIÓLOGO	10
CAPÍTULO 5. ACTIVIDADES A DESEMPEÑAR POR EL QUÍMICO ANALISTA EN MICROBIOLOGÍA	11
CAPÍTULO 6. CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO EN EL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA.....	12
6.1 Equipo Mínimo Necesario	12
6.2 Materiales Auxiliares requeridos en el laboratorio.	13
6.3 Medios de cultivo utilizados.....	14
6.4 Tinciones Microbiológicas.	16
6.4.1 Tinción de Gram	16
6.4.2 Tinción Shaeffer-Fulton.....	17
6.4.3 Tinción de azul de algodón de lactofenol.....	18
6.5 Limpieza y desinfección.....	19



6.6 Esterilización.....	20
6.7 Cepario	21
CAPÍTULO 7. CALIBRACIÓN DE EQUIPOS UTILIZADOS EN CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO	22
7.1 Definición.....	22
7.2 Equipos sometidos a calibración.....	22
CAPÍTULO 8. VALIDACIÓN DE MÉTODOS REQUERIDOS EN CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO	24
8.1 Características Analíticas en la validación de un método analítico.	24
8.2 Calificación de equipos o instrumentos de laboratorio.	25
8.2.1 Etapas para la calificación de equipos.....	25
CAPÍTULO 9. CONTROL DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO.....	26
9.1 Control ambiental.....	26
9.2 Control de personal.....	27
9.2.1 Métodos de control para el personal.....	28
9.3 Control de equipos y superficies	29
9.3.1 Placa de contacto o placas RODAC.....	29
9.3.2 Hisopado de superficies y equipos.....	29
CAPÍTULO 10. CONSERVADORES UTILIZADOS EN COSMÉTICOS.....	30
10.1 Definición de conservadores.....	30
10.2 Tipos de conservadores.....	31
10.3 Mecanismos de acción de conservadores.....	32
CAPÍTULO 11. MICROORGANISMOS COMÚNMENTE ENCONTRADOS EN COSMÉTICOS	33
11.1 Aspectos generales de los microorganismos localizados en cosméticos.....	34
11.1.1 Bacterias más frecuentes encontradas en cosméticos	34
11.1.2 Levaduras y Hongos filamentosos más frecuentes encontrados en cosméticos.....	39
CAPÍTULO 12. PRINCIPALES FUENTES DE CONTAMINACIÓN DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN	42
12.1 Materia prima.....	42
12.2 Medio Ambiente.	43
12.3 Contaminación del producto a causa del personal.....	43
12.3.1 Cuidado de la salud del personal.	44
12.3.2 Manipulación adecuada del producto.	44
12.3.3 Higiene del personal.....	45

12.3.4 Equipo de protección personal.	45
12.4 Equipos y componentes destinados al producto final.	45
CAPÍTULO 13. MANEJO ADECUADO DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	46
CAPÍTULO 14. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUA DE PROCESO.	47
14.1 Técnica de Muestreo para el agua de proceso.	47
14.2 Método de cuenta de microorganismos en placa.	47
14.3 Crecimiento en caldo nutritivo.....	48
14.4 Determinación de bacterias coliformes. Técnica de número más probable (NMP)	49
14.4.1 Fase presuntiva (posible presencia de coliformes totales)	49
14.4.2 Fase confirmativa (para coliformes totales y coliformes fecales).....	51
14.5 Detección de bacterias coliformes: Técnicas enzimáticas (Readycult®).....	53
14.6 Límites permisibles de crecimiento microbiológico para agua de proceso.....	55
CAPÍTULO 15. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO EN COSMÉTICOS.....	56
15.1 Evidencia de crecimiento en caldo CLM y CDS.....	56
15.1.1 Caldo letheen modificado (CLM).....	56
15.1.2 Caldo dextrosa sabouraud (CLM)	56
15.2 Cuenta total de Microorganismos en placa.	57
15.2.1 Cuenta total de mesófilos aerobios en placa.	58
15.2.2 Cuenta total de Hongos y Levaduras en placa.	59
15.2.3 Cuenta total de Coliformes totales en placa.	60
15.3 Cuenta total de Microorganismos en pruebas rápidas Placas 3M™ Petrifilm™.	61
15.3.1 Preparación de la muestra para el recuento de Mesófilos aerobios, Hongos, Levaduras y Coliformes totales en Placas 3M™ Petrifilm™.....	61
15.3.2 Siembra de la muestra para recuento de Mesófilos aerobios, Hongos, Levaduras y coliformes totales en Placas 3M™ Petrifilm™.	62
15.3.3 Incubación de las Placas 3M™ Petrifilm™ para recuento de Mesófilos aerobios, Hongos, Levaduras y Coliformes Totales.....	63
15.3.4 Interpretación de las Placas 3M™ Petrifilm™ para recuento de Mesófilos aerobios, Hongos, Levaduras y Coliformes Totales.	63
15.3.5 Almacenamiento adecuado para las placas 3M™ Petrifilm™	67
15.4 Etapa de identificación.....	67
CAPÍTULO 16. LÍMITES MICROBIOLÓGICOS PERMISIBLES EN COSMÉTICOS	68
CAPÍTULO 17. BITÁCORA DE ANÁLISIS Y EMISIÓN DE DICTAMEN MICROBIOLÓGICO	69
17.1 Bitácora de análisis microbiológico.....	69
17.2 Emisión de dictamen microbiológico y certificado de análisis.....	69

CAPÍTULO 18. MANEJO Y DESECHO ADECUADO DE RPBI EN LA INDUSTRIA COSMÉTICA.....	71
18.1 Clasificación de RPBI y de establecimientos generadores.	72
18.2 Envasado adecuado de RPBI	73
18.3 Almacenamiento temporal.	75
17.4 Recolección de RPBI	76
16.5 Tratamiento y disposición final de RPBI.....	76
CONCLUSIÓN	77
REFERENCIAS.....	78
ANEXO A. TABLAS PARA LA DETERMINACION DE NÚMERO MÁS PROBABLE	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Theodor Escherich</i> científico Alemán realizó el primer aislamiento de <i>Escherichia coli</i>	2
Figura 2. Instituciones nacionales e internacionales encargadas de regular el control de calidad microbiológico en la industria	3
Figura 3. Comercio Exterior de Productos Cosméticos México, 2008-2014.....	6
Figura 4. Clasificación de cosméticos por su forma de uso o su zona de aplicación.....	7
Figura 5. Clasificación de medios de cultivo.....	13
Figura 6. Diagrama de procedimiento para tinción de Gram.....	14
Figura 7. Ejemplos de bacterias teñidas con tinción de Gram.....	15
Figura 8. Diagrama de procedimiento para tinción de Shaeffer-Fulton	15
Figura 9. <i>Bacillus sp</i> , visualizado con la técnica de tinción para endosporas Shaeffer-FultonK.....	16
Figura 10. Diagrama de procedimiento para tinción de azul de algodón lactofenol.....	16
Figura 11. <i>Mucor spp</i> , Tinción de azul de algodón lactofenol.....	17
Figura 12. Clasificación de los diferentes métodos de esterilización del laboratorio de Microbiología.....	18
Figura 13. Medidas preventivas para el personal de operación.....	42
Figura 14. Condiciones adecuadas para el muestreo de muestras cosméticas de acuerdo en el punto del proceso en el que se encuentra.....	44
Figura 15. Condiciones adecuadas para el almacenaje de espera para análisis microbiológico de muestras cosméticas de acuerdo en el punto del proceso en el que se encuentre.....	44
Figura 16. Metodología para la cuenta de microorganismos mesófilos aerobios.....	46
Figura 17. Metodología para la técnica de crecimiento en caldo nutritivo para <i>Pseudomonas spp</i>	47
Figura 18. Metodología para la fase presuntiva de la técnica Número más probable.....	48
Figura 19. Ejemplo de tubo positivo de la prueba presuntiva.....	49
Figura 20. Ejemplo de tubo negativo de la prueba presuntiva.....	49
Figura 21. Metodología para la fase confirmativa de la Técnica Número más probable (NMP).....	50
Figura 22. Ejemplo de tubo positivo de la prueba confirmativa para coliformes totales.....	50
Figura 23. Ejemplo de tubo negativo de la prueba confirmativa.....	51
Figura 24. Metodología para la determinación de bacterias coliformes por la técnica enzimática ReadyCult®.....	52
Figura 25. Metodología para la técnica de Evidencia de crecimiento microbiológico en CLM y CDS.....	55



Figura 26. Metodología para la técnica de cuenta de microorganismos mesófilos en placa para cosméticos.....	56
Figura 27. Metodología para la técnica de cuenta de Hongos y levaduras en placa para cosméticos.....	57
Figura 28. Metodología para la técnica de para la cuenta de Coliformes Totales en placa para cosméticos.....	58
Figura 29. Preparación de diluciones de muestras cosméticas para placas 3M™ Petrifilm™.....	60
Figura 30. Metodología para la siembra en placas 3M™ Petrifilm™.....	60
Figura 31. Recuento 0, Placa Petrifilm para recuento de Mesófilos aerobios sin colonias.....	62
Figura 32. Recuento 16. El indicador presente en la placa pigmenta todas las colonias. Contar todas las colonias rojas independiente del tamaño.....	62
Figura 33. Recuento 420, en placas cuyo número de colonias es mayor a 300, contar las colonias que se encuentran en una cuadrícula y multipolar por 20 para tener el recuento total.....	62
Figura 34. Recuento 44, Placa Petrifilm para recuento de Levaduras.....	63
Figura 35. Recuento 12, Placa Petrifilm para recuento de Hongos.....	63
Figura 36. Condiciones adecuadas de almacenamiento para las bolsas de placas 3M™ Petrifilm™.....	65
Figura 37. Formato de reporte de análisis microbiológico.....	68
Figura 38. Símbolo universal de riesgo biológico.....	71
Figura 39. Contenedor de plástico temporal para RPBI.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Acontecimientos importantes que marcaron el inicio del control de calidad.....	1
Tabla 2. Acontecimientos importantes para el inicio del control de calidad microbiológico.....	1
Tabla 3. Instituciones Internacionales y sus principales funciones.....	4
Tabla 4. Instituciones Nacionales y sus principales funciones.....	5
Tabla 5. Clasificación de productos cosméticos de acuerdo a su forma de presentación.....	8
Tabla 6. Equipo necesario en el laboratorio de Microbiología.....	11
Tabla 7. Materiales Auxiliares necesarios en el laboratorio de Microbiología	12
Tabla 8. Químicos desinfectantes más utilizados.....	18
Tabla 9. Equipos sometidos a calibración.....	21
Tabla 10. Características Analíticas típicas en la validación de un método analítico.....	23
Tabla 11. Métodos utilizados para determinar la calidad del aire en zonas de trabajo.....	24
Tabla 12. Equipo de protección personal.....	25
Tabla 13. Principales familias de conservadores utilizados en cosméticos.....	29
Tabla 14. Modo de actividad antimicrobiana de conservadores.....	30
Tabla 15. Bacterias más frecuentes encontradas en cosméticos.....	32
Tabla 16. Hongos filamentosos y levaduras más frecuentes aislados de cosméticos.....	32
Tabla 17. Ejemplos de Enterobacterias encontradas en cosméticos.....	33
Tabla 18. Ejemplos de Coliformes Totales encontrados en cosméticos.....	34
Tabla 19. Grado de susceptibilidad de crecimiento microbiológico en productos cosméticos.....	40
Tabla 20. Tipo de origen de la materia prima.....	41
Tabla 21. Límites permisibles para agua de proceso establecidos en Normas Oficiales Mexicanas.....	53
Tabla 22. Condiciones de incubación para placas 3M™ Petrifilm™ dependiendo del tipo de microorganismo sembrado.....	61
Tabla 23. Interpretación para las placas 3M™ Petrifilm™ de coliformes totales en sus formas de crecimiento habituales	64
Tabla 24. Límites permisibles para cosméticos.....	66
Tabla 25. Información mínima necesaria para el registro de muestras en bitácora.....	67
Tabla 26. Clasificación de establecimientos generadores de RPBI de acuerdo a la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002	70
Tabla 27. Clasificación de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos de acuerdo a la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002	70
Tabla 28. Disposición de envasado para RPBI de acuerdo a la NOM-087-SEMARNAT-SSA1 2002.....	71
Tabla 29. Periodo de almacenamiento de acuerdo a la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.....	73

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ufc/ml	Unidad formadora de colonia por mililitro de muestra
NMP	Número más probable (Técnica para detección de coliformes totales y fecales)
CANIPEC	Organización conformada por la Cámara Nacional de la Industria de Productos Cosméticos y la Asociación Nacional de la Industria de Productos de Cuidado Personal y del Hogar A.C
DNA - ADN	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - Acido desoxirribonucleico
µm	Micrómetro o micra
ALM	Agar Letheen Modificado
CLM	Caldo Letheen Modificado
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
TSA - AST	<i>Trypticase Soy Agar</i> – Agar Soya Trypticaseina
SDA – ADS	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i> – Agar Dextrosa Sabouraud
ABRV	Agar Bilis Rojo Violeta
PIB	Producto Interno Bruto
CDS	Caldo Dextrosa Sabouraud
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> – Administración de Alimentos y Medicamentos
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> – Organización Internacional de Normalización
NOM	Norma Oficial Mexicana
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
BIOFILM- BIOCAPA	Microorganismos en asociación adheridas en las paredes de las tuberías de distribución de agua, formando parte de la microbiota del mismo y al propagarse puede ocasionar la contaminación de la muestra.
Vo. Bo.	Visto Bueno

OBJETIVO

Describir un panorama general de los aspectos que abarca el control de calidad microbiológico en productos cosméticos, mediante la consulta de referencias escritas y electrónicas para conocer las metodologías de análisis descritas por instituciones regulatorias nacionales e internacionales.

JUSTIFICACIÓN

Este documento busca describir los aspectos mínimos operacionales que debe de cubrir un laboratorio del área de calidad para poder efectuar un correcto control de calidad microbiológico en productos cosméticos, es necesario conocer todos los aspectos a controlar que conllevan al análisis y que repercusiones puede tener el no realizar un control adecuado.

Para esto el encargado de los análisis microbiológicos debe de conocer todos los requerimientos que debe cumplir sus procedimientos frente a instituciones nacionales e internacionales de normatividad, al ser efectuados de manera adecuada y regulada los resultados de análisis serán representativos y confiables, garantizando la seguridad del producto para el consumidor.

Esta tesis se realizó con el fin de proporcionar una guía útil y funcional para el estudiante o recién egresado, el cual quiera desarrollarse en esta área, ya sea laborando en una industria ya establecida o para la formación de una empresa.

INTRODUCCIÓN

El término *calidad*, ha sido utilizado con más frecuencia al pasar los años por todo tipo de industrias e instituciones que fabriquen productos para el consumo o que ofrezcan un servicio determinado.

Dada la importancia que alberga este término, es necesario definir que es la calidad. Existen muchas definiciones de la calidad, una de las más completas es: *El conjunto de características y propiedades que reúne el producto, proceso o servicio, el cual logra satisfacer las necesidades del cliente, del personal encargado de desarrollarlo (del producto, proceso o servicio) así como de la sociedad en general.*

Principalmente, se ha tomado como modelo de referencia a nivel internacional la definición proporcionada por la norma ISO 9000:2015 la cual tiene como definición de calidad: *Grado en el que un conjunto de características inherentes cumple con los requisitos.*

Entendiéndose por requisito “necesidad o expectativa establecida, generalmente obligatoria implícita”. (ISO9000, 2005, pág. 8).

Dentro del área del control de calidad, se encuentran los análisis microbiológicos. Puesto que los agentes microbianos pueden desarrollarse en ciertos productos susceptibles a la contaminación, poniendo el riesgo la salud del cliente o consumidor.

El análisis microbiológico dentro del control de calidad es de carácter preventivo, nos permite valorar la carga microbiana de cualquier producto que pretenda ponerse a la venta y este pueda tener contacto directo con el organismo del cliente. Con el análisis microbiológico se busca encontrar, controlar o erradicar las posibles fuentes de contaminación o multiplicación microbiana. En esto radica la importancia de realizar los análisis microbiológicos dentro de la industria; ya sea alimentaria, cosmética o farmacéutica.

Si llega a existir la liberación de los productos sin análisis microbiológico previo, las entidades o instituciones encargadas de regular la calidad de los productos restringirían la venta de los mismos, y en última instancia cuando el producto se encuentra contaminado por microorganismos patógenos, puede comprometer la salud del cliente. Lo cual puede causar pérdida de reputación de la calidad del producto, y específicamente la calidad de la empresa, ocasionando en la mayoría de los casos demandas y pagos por daño al cliente, lo que esto deriva en una pérdida económica significativa para el sector industrial. (Instituto Nacional de Tecnología Industrial Argentina,2015)

Existen normas e instituciones encargadas de asegurar que los análisis microbiológicos sean realizados a estos productos, así como establecer los procedimientos estandarizados para realizar dichos análisis.



CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 Inicios del control de calidad

El control de calidad tiene una historia muy amplia y compleja, pero dentro de ella existieron acontecimientos que marcaron el rumbo de los estudios de calidad dentro de la industria. A continuación en la tabla No.1 se desglosan estos principales acontecimientos:

Tabla 1. Acontecimientos importantes que marcaron el inicio del control de calidad

Año y Personaje destacado	Acontecimiento
1875- Vilfredo Pareto	Estudio de la economía y sociología enfocado especialmente en el campo de la distribución de la riqueza y el análisis de las elecciones individuales (Universidad Nacional Autónoma de México, 2009)
1875- Frederic W. Taylor	Principio de la Administración científica, estableciendo la división del trabajo de unidades más pequeñas, para que se lleven a cabo con mayor facilidad. (Hernandez Landa , 2015)
1900- Henry Ford	Estableció el modo de producción en cadena, especialización de tareas y reproducción de costos (Alvarado, 2013)
1924- Walter Shewhart	Ideó el concepto del ciclo PDCA o “círculo de Deming”, el cual proporciona una estrategia de mejora continua en cuatro pasos: Planificar, hacer, verificar y actuar. (Miranda Gonzalez , Chamorro Mera, & Rubio Lacoba , 2007)
1938- Edward Deming	Postuló los 14 puntos de la calidad, convirtiendo a Japón en líderes del mercado mundial. (Quality-systems, 2013)
1941- Joseph Juran	Estableció la trilogía de la calidad, correspondiente a un esquema que consta de tres procesos: Planear, controlar y mejorar. (Escalante, 2008)
1943- Kaoru Ishikawa	Creación del diagrama causa-efecto o espina de Ishikawa (Escalante, 2008)
1980- Philip Crosby	Estableció cuatro principios absolutos de la administración de la calidad (Summers, 2006)

1.2 Inicios de la Microbiología

Tabla 2. Acontecimientos importantes para el inicio del control de calidad microbiológico

Año y Personaje destacado	Acontecimiento
1665- Robert Hook	Observación de la primera célula. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2013)
1684- Antoni Van Leeuwenhoek	Primeras descripciones de las bacterias. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2013)
1798- Edward Jenner	Desarrollo la vacuna contra la viruela. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2013)
1857, 1860, 1864 Louis Pasteur	Fermentación ácido-láctica Papel de las levaduras en la fermentación alcohólica Esclarecimiento a la teoría de la Generación espontánea. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2013)
1881, 1884 Robert Koch	Métodos de estudio de bacterias en cultivos puros. Postulados de Koch (Universidad Nacional Autónoma de México, 2013)
1884- Christian Gram	Técnica de Tinción de Gram. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2013)
1901- Martinus Beijerinck	Método de enriquecimiento de cultivos. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2013)

1929- Alexander Fleming

Descubrimiento de la Penicilina. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2013)

Para que los análisis microbiológicos tomaran gran importancia en el ramo industrial e incluso formaran parte de los requisitos indispensables para la venta de cierto tipo de productos (Alimentos, Medicamentos, Cosméticos, Productos de cuidado personal, etc.), es importante destacar los sucesos más importantes dentro de la rama de la Microbiología, los cuales se muestran en la Tabla No.2 :

1.3 Introducción de los análisis microbiológicos como parte fundamental del control de calidad en la industria

A lo largo de la historia se ha descubierto que en los productos de consumo como alimentos, agua, medicamentos y cosméticos pueden crecer microorganismos patógenos, causantes de daño a la salud o incluso matar al consumidor. La necesidad de realizar análisis microbiológicos, dentro de la industria de los productos de consumo fue tomando importancia poco a poco al ir descubriendo microorganismos propensos a crecer en estos productos provocando enfermedades al consumidor, empezando principalmente en 1885 donde *Theodor Escherich* aisló una bacteria procedente de la materia fecal de infantes. Que después, fue nombrada *Escherichia coli*, en su honor. (Avalos, 1999).

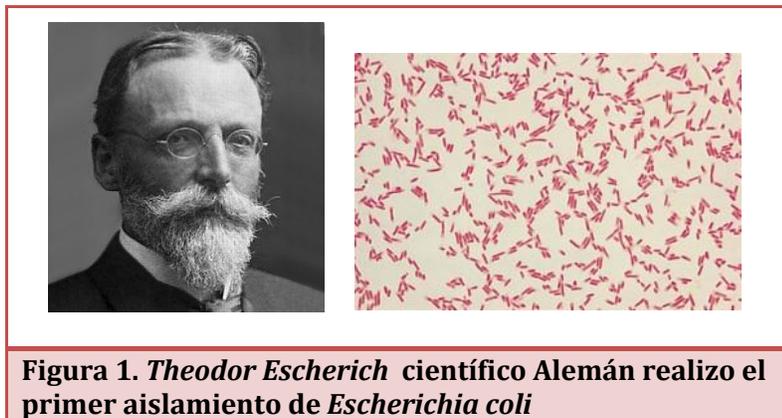


Figura 1. *Theodor Escherich* científico Alemán realizo el primer aislamiento de *Escherichia coli*

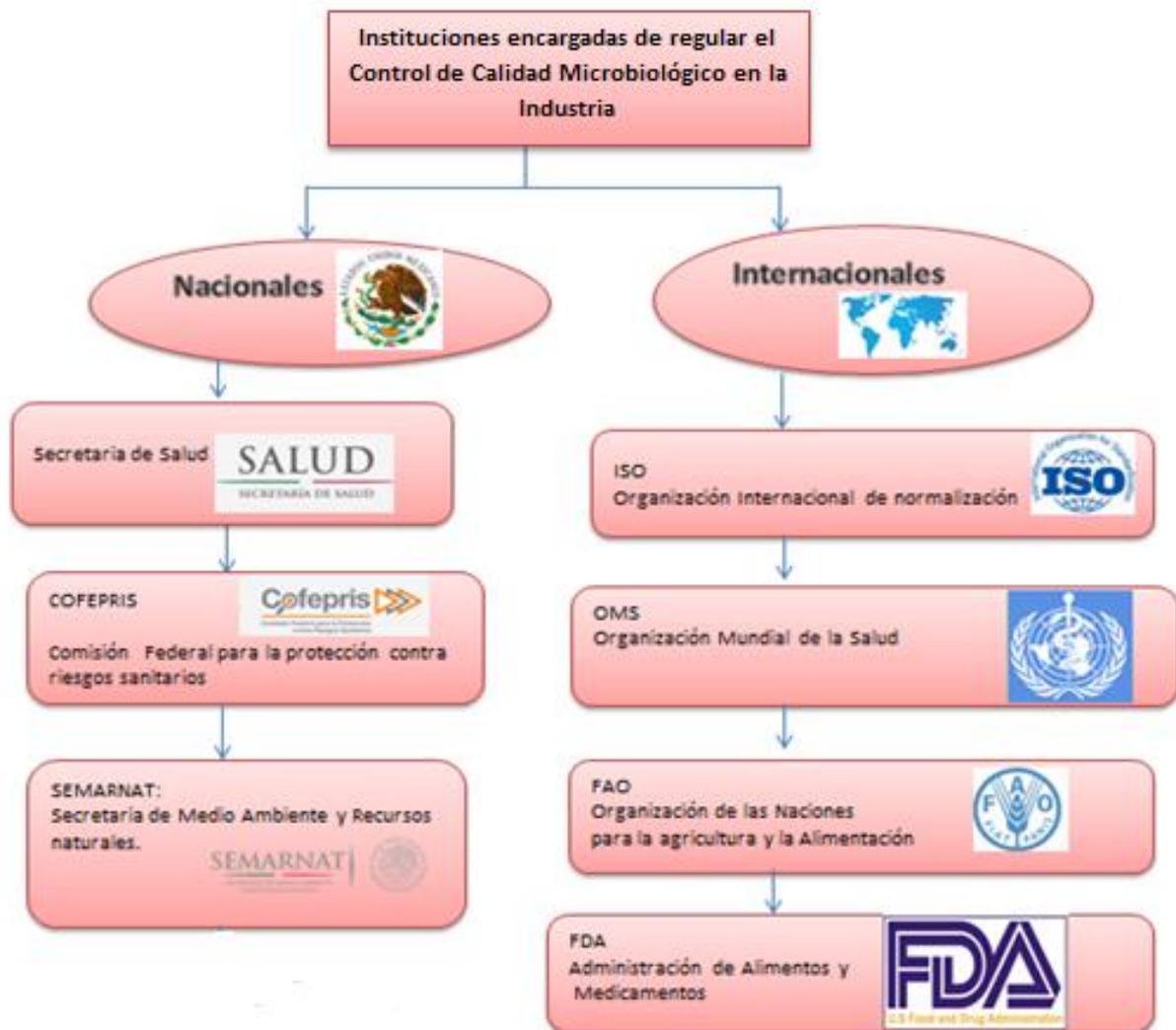
Con esto se pudo relacionar que en los productos contaminados con materia fecal, se encontraría la presencia de esta bacteria, obteniendo uno de los parámetros más importantes de control. A partir de esto se fueron descubriendo más patógenos relacionados con los productos de consumo como *Clostridium perfringens* (1900), *Salmonella enteritidis* (1888), *Staphylococcus aureus* (1894), *Shigella dysenteriae* (1898) (Ledermann, 2007)

Al regular las determinaciones de la presencia de microorganismos en los productos para el consumo, era necesario expedir leyes o requerimientos para regular la calidad microbiológica de alimentos, agua, medicamentos y cosméticos con la cual poder estandarizar los procesos, y estos se realicen de igual forma en distintas partes del mundo. Ya que en cada laboratorio se contaba con un método distinto y muchas veces poco eficiente. En 1899 la Asociación Americana de Salud Pública (APHA) eligió un comité para poder establecer procedimientos estándar de análisis de Agua. En 1905 este comité publicó la primera edición del manual llamado " *Métodos estándar para el análisis del agua* ", en el cual incluye análisis físicos, químicos y microbiológicos. (Wilhelm, 2013)

Gracias a esto, a lo largo del tiempo se fueron estableciendo diversos comités, donde se desarrollaron una gran cantidad de informes que recopilaban métodos para el análisis microbiológico del agua y alimentos. Uno de los más importantes es la AOAC (Asociación oficial de

comunidades analíticas) fundada en 1884, encargada del desarrollo y validación de métodos analíticos como también el mejoramiento de los procesos de aseguramiento de la calidad de los laboratorios tanto en Química como Microbiología (Torres, 2012). Otra organización importante es ICMSF (La comisión internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos) constituida en 1962, con el objetivo de ofrecer información para las industrias en asuntos de seguridad microbiológica en alimentos. (Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológica en Alimentos, 2006)

En la industria cosmética en 1969, la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) realizó un estudio en Nueva York donde demostró que cerca del 25 % de los cosméticos en el mercado estaban contaminados con bacterias, donde la mayoría resultó ser bacterias Gram negativas, como resultado de esto, se implementó el uso de conservadores que eliminaran a estos microorganismos, gracias a esto se dio un decrecimiento del 2% de la proporción de la contaminación para el año de 1975 (Espinosa, 2001).



1.4 Instituciones internacionales y nacionales que rigen el cumplimiento del análisis microbiológico dentro del control de calidad.

Como se ha mencionado con anterioridad existen entidades u organizaciones encargadas de regular que estos análisis microbiológicos sean realizados para cada producto de consumo que se desee poner en el

mercado, estas instituciones tienen restricciones nacionales e internacionales las cuales se muestran en la Figura No.2

Figura 2: Instituciones nacionales e internacionales encargadas de regular el control de calidad microbiológico en la industria.

1.5 Instituciones encargadas de regular el control de calidad microbiológico en la industria

1.5.1 Instituciones Internacionales:

En la Tabla No.3 se desglosan las Instituciones internacionales que regulan el control de calidad microbiológico para las industrias y las principales funciones que estas desempeñan:

Tabla 3. Instituciones Internacionales y sus principales funciones

Nombre de la institución	Año de fundación	Funciones Principales	Productos que regula o ámbitos de trabajo
ISO (Organización Internacional de normalización)	1946	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Buscar la mejora de los procesos productivos mediante la optimización de recursos. ▪ Crear estándares de calidad que pueden ser utilizadas en cualquier rama de producción. ▪ Normalización de normas existentes en la cual incluye: procesos de formulación, elaboración, aplicación y mejoramiento de las mismas. 	Aplicable a cualquier procedimiento.
FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) (En Estados Unidos de America)	1906	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proveer al consumidor información con base científica que asegure la seguridad de utilizar cierto medicamento o alimento. ▪ Innovación de productos para favorecer la salud del consumidor. ▪ Proteger la salud del consumidor mediante la regulación de productos para el consumo humano o veterinario. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alimentos (Excepto la mayoría de carne y aves de corral ya que estas son reguladas por el departamento de Agricultura de cada país). ▪ Aditivos alimenticios. ▪ Formulas infantiles (Ejemplo Fórmulas lácteas) ▪ Suplementos Alimenticios o dietéticos. ▪ Medicamentos para consumo humano. ▪ Productos biológicos y Productos derivados de la sangre. ▪ Dispositivos médicos. ▪ Productos electrónicos que emitan radiaciones (Ejemplo: Microondas, equipos de rayos X) ▪ Cosméticos ▪ Alimentos, Medicamentos y dispositivos para animales domésticos, animales de granja, etc. ▪ Productos derivados del tabaco.
OMS (Organización Mundial de la Salud)	1948	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ser líderes en temas importantes de salud y ser participe cuando se requieran actuaciones conjuntas. ▪ Determinar líneas de investigación, así como la traducción y divulgación de las mismas. ▪ Definir normas y darle seguimiento a su aplicación en la práctica. ▪ Impulsar el cambio, prestando apoyo técnico. ▪ Estar en seguimiento continuo cualquier situación en materia de salud y determinar las indicaciones sanitarias. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sistemas de salud. ▪ Enfermedades no transmisibles. ▪ Enfermedades infecciosas. ▪ Prevención, vigilancia y respuesta.

FAO (Organización de las Naciones para la Agricultura y la Alimentación)	1945	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ayuda a la erradicación del hambre, inseguridad en los alimentos, y la mala nutrición. ▪ Hacer sustentable y productiva actividades fundamentales como; la agricultura y la pesca. ▪ Reducir la pobreza. ▪ Implementar sistemas agrícolas y alimentarios inclusivos y eficientes 	Países pertenecientes a la ONU
---	-------------	---	--------------------------------

1.5.2 Instituciones Nacionales:

Al igual que las instituciones internacionales de regulación, existen instituciones encargadas de regular la seguridad de los productos que puedan causar daño al consumidor, la normatividad expedida por estas instituciones son de carácter obligatorio para todo el territorio nacional. Las instituciones Nacionales a cargo de la normatividad se muestran en la Tabla No.4:

Tabla 4. Instituciones Nacionales y sus principales funciones

Nombre de la institución	Año de fundación	Funciones Principales
SECRETARÍA DE SALUD	1946	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dirigir y supervisar el cumplimiento del plan de salud dentro del territorio nacional y el plan departamental de desarrollo en el sector salud. ▪ Dirigir y supervisar en coordinación con el gobierno municipal llevar a cabo las políticas, programas y normas en materia de salud. ▪ Asegurar la salud en todo el territorio nacional garantizando el acceso a la población a los servicios de salud. ▪ Dirigir y supervisar el desarrollo del sistema de seguridad social. ▪ Asegurar el cumplimiento de las disposiciones legales en materia de salud. ▪ Promover el desarrollo de investigaciones en Sistemas de seguridad social en salud. ▪ Dirigir, coordinar y supervisar programas de prevención y atención a emergencias en materia de salud. ▪ Dirigir los fondos monetarios destinados a la salud.
COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios)	2001	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vigilancia y control de establecimientos de salud. ▪ Controlar y prevenir riesgos a la salud del hombre causado por factores ambientales. ▪ Control sanitario de productos y servicios así como su exportación e importación de los establecimientos dedicados al proceso de dichos productos. ▪ Control sanitario del proceso, uso, mantenimiento, exportación, importación y disposición final de equipos médicos, agentes de diagnóstico, prótesis, etc. ▪ Control sanitario de la publicidad de las actividades, productos y servicios. ▪ Control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y sus componentes ▪ Control sanitario para donación de órganos, tejidos y células de seres humanos.
SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales)	2000	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Conservación y aprovechamiento sustentable de los ecosistemas y la biodiversidad dentro del territorio mexicano. ▪ Prevención y control de contaminación. ▪ Gestión integral de los recursos hídricos. ▪ Combate al cambio climático.

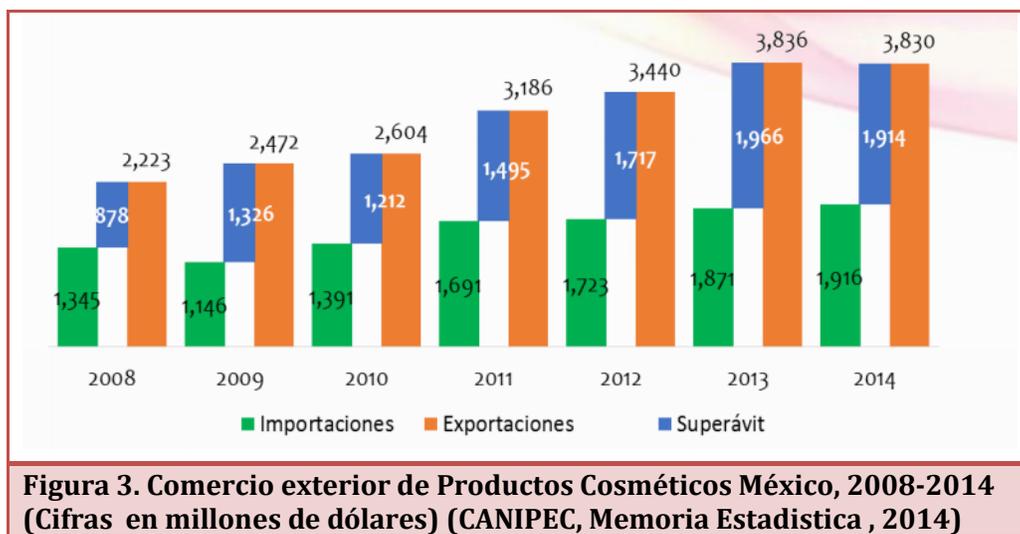
CAPÍTULO 2. INDUSTRIA COSMÉTICA EN MÉXICO

La industria cosmética ha tomado cada vez más importancia en la economía mexicana, debido a la cultura de higiene personal que tiene el país por lo cual los productos cosméticos son utilizados día con día. Desde el uso del champú, acondicionador, desodorante, perfumes y demás productos para la mejora estética.

2.1 Crecimiento de la industria cosmética en México

La CANIPEC (Cámara y Asociación de la Industria del Cuidado Personal y del Hogar) determina que la industria del cuidado personal está conformado por la fabricación de productos para el cabello, piel, uñas, maquillaje, cuidado oral, cuidado íntimo y modificación del olor corporal. (Cámara Nacional de la Industria de Productos de Cuidado Personal y del Hogar, 2016)

La industria cosmética mexicana ocupa el tercer lugar en producción de cosméticos, después de EE.UU y Brasil en el continente americano. En el mercado interno la industria cosmética genera alrededor de 250 mil empleados directos e indirectos además aporta el 0.7% de la industria manufacturera y el 4.2% del PIB (Producto Interno Bruto) de la industria química. En 2009, generó 24 mil empleos directos, que equivalen al 10.7% de la industria Química además de los empleos indirectos que incluyen a los vendedores y distribuidores. (Secretaría de Economía, 2009). En la Figura No. 3 se muestra el crecimiento de las importaciones y exportaciones de productos cosméticos fabricados en México.



Para el 2014 la industria cosmética en México ocupó el décimo lugar en ventas por 10 mil 843 millones de dólares, por debajo de mercados como Francia, Rusia e Italia (Hernández, 2014).

Este crecimiento tan importante es debido a:

- Un aumento significativo en la población.
- Mujeres mejor posicionadas económicamente.
- Publicidad en aumento.

- Aumento de industrias cosméticas mexicanas.
- Cambio en las costumbres.
- Desarrollo de productos atractivos para el género masculino.
- Especialización de productos.
- Aumento de la calidad en la fabricación de cosméticos en industrias mexicanas

CAPÍTULO 3. ASPECTOS GENERALES DE LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS

3.1 Definición de cosméticos

La FDA tiene como definición de cosméticos: *“Artículos o sustancias destinados a ser aplicados (frotados, vertidos, rociados o atomizarse) en el cuerpo humano para limpiar, embellecer o alterar la apariencia sin afectar la estructura del cuerpo o sus funciones”* (FDA, 2012). Por parte de la normatividad mexicana los cosméticos se definen como: *“Sustancias o formulaciones destinadas a ser puestas 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 mucosas bucales con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, ayudar a modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales o atenuar o prevenir deficiencias o alteraciones en el funcionamiento de la piel sana”*(NOM-141-SSA1-1995,1997). De acuerdo con el artículo 269 de la Ley general de salud (LGS) se consideran como productos de perfumería y belleza a:

- Los productos de cualquier origen, independientemente de su estado físico, destinados a modificar el olor natural del cuerpo humano.
- Los productos o preparaciones de uso externo destinados a preservar o mejorar la apariencia personal.
- Los productos o preparados destinados al aseo de las personas y los repelentes que se apliquen directamente a la piel.

El producto cosmético debe de cumplir ciertas cualidades para poder ser considerado dentro de esta clasificación:

- Mantener la integridad de la piel.
 - No alterar el pH fisiológico o bien permitir una rápida reintegración del mismo.
 - Debe de ser inocuo, libre de sustancias tóxicas o libre de microorganismos.
 - Tener una textura agradable.
 - Ser de fácil utilización.
- (Claude Martini & Chivot, 1997)

3.2 Clasificación de cosméticos

Existen diversas clasificaciones para los cosméticos de acuerdo a varios parámetros, a continuación se mencionan las clasificaciones más importantes en la Figura 4 y Tabla 5:

Figura 4. Clasificación de cosméticos por su forma de uso o su zona de aplicación. (Junipero, 2015)

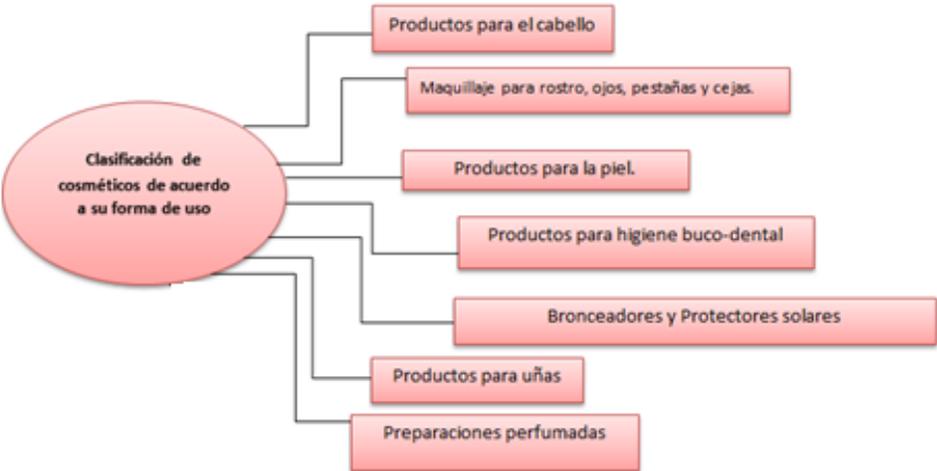


Tabla 5. Clasificación de productos cosméticos de acuerdo a su forma de presentación (Junipero, 2015)

Forma de presentación	Características	Imagen
Diluciones y lociones	Forma cosmética donde el excipiente y los principios activos se encuentran perfectamente disueltos, teniendo como principal objetivo perfumar el cuerpo. Ejemplo: Perfumes, colonias.	
Emulsiones	Mezcla formada por líquidos inmiscibles, que se encuentran uniformemente distribuidos, estabilizadas por un emulsionante. Ejemplos: Todo tipo de cremas, algunos acondicionadores, desodorantes y protectores solares además de mascara para pestañas.	
Suspensiones	Sus componentes se encuentran en estado sólido, dispersas dentro de un excipiente líquido, junto con espesantes (hacen al excipiente más viscoso y dificulta el movimiento de las partículas sólidas). Ejemplo: Maquillaje líquido, Exfoliantes, Esmaltes, y Geles.	
Espumas	Formas cosméticas en las que en el excipiente es incorporado cierta cantidad de gas en forma de burbujas a presión. Ejemplo: Espumas fijadoras, espumas para afeitarse, espumas limpiadoras de rostro.	
Sólidos en polvo	Compuestos pulverizados constituidos por excipientes sólidos, pueden ser polvos sueltos como el talco, rubor en polvo o bien polvos compactos, en el cual se incorpora un agente ligante y es envasado a presión como: sombras, maquillajes, rubor.	
Sólidos en barra	El excipiente se mantiene líquido a una temperatura elevada y se introduce en un molde donde se solidifica al enfriarse. Ejemplos: Labiales, correctores, delineadores, rubor en barra.	

CAPÍTULO 4. REQUERIMIENTOS QUE DEBE CUMPLIR EL QUÍMICO ANALISTA MICROBIÓLOGO

Para seleccionar a la persona adecuada para el puesto de Químico Analista en Microbiología, este debe de cumplir con requisitos que son indispensables para desempeñar este puesto, ya que representa un puesto de mucha responsabilidad, esta persona no solo es el encargado de los resultados de laboratorio microbiológico, también debe asesorar a todo el personal que tenga contacto con el producto durante todo el proceso de producción para que estos se lleven a cabo adecuadamente y así poder cumplir con las especificaciones microbiológicas. Los requisitos mínimos que debe de cumplir el personal con el puesto de Químico Analista en Microbiología, son los siguientes:

- a. **Formación académica:** La formación académica tiene que constar de conocimientos teóricos y prácticos del área de microbiología, el cual debe de cubrir los siguientes temas:
 - Bioseguridad en el laboratorio.
 - Técnicas básicas de Microbiología.
 - Uso del microscopio óptico así como sus cuidados necesarios.
 - Cultivos microbiológicos.
 - Esterilización y preparación de medios de cultivo.
 - Tinciones microbiológicas.
 - Esterilización de material, medidas necesarias para trabajar en condiciones de esterilidad, técnicas de asepsia y antisepsia.
 - Técnicas de siembra, aislamiento e identificación de microorganismos.
 - Técnicas para la cuenta o enumeración de microorganismos presentes en distintos tipos de muestras.
 - Conservación de cepas (cepas de referencia).
 - Residuos peligrosos biológicos infecciosos.
 - Técnicas de muestreo.
 - Efectividad de conservadores.
- b. **Experiencia laboral:** Es necesario contar con experiencia dentro del análisis microbiológico en la industria, esta tiene cubrir los siguientes aspectos:
 - Conocimiento y manejo de Buenas prácticas de documentación.
 - Conocimiento y manejo de Buenas prácticas de manufactura.
 - Conocimiento y manejo de Buenas Prácticas de Laboratorio.
 - Normatividad relacionada con el análisis microbiológico en cosméticos.
 - Manejo y desecho de RPBI
- c. **Capacitación del puesto:** Para que el analista desempeñe su trabajo de manera adecuada es necesario que la empresa encargada de contratarlo, cuente con un programa documentado de capacitación, en este programa debe de cubrir los siguientes aspectos (Federacion, 2008):
 - Inducción al puesto a desempeñar.
 - Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP).
 - Buenas Prácticas de Documentación (GDP).
 - Buenas Prácticas de Manufactura (GMP).
 - Procedimientos internos utilizados por la empresa.
 - Seguridad e Higiene Industrial.
 - Manejo y desecho de RPBI

Aunque en algunos aspectos por experiencia laboral ya cuente con estos conocimientos es importante que la empresa los refuerce para que esta tenga evidencia documental de que el Químico analista cuenta con todos los conocimientos para desempeñar el puesto de manera correcta.

CAPÍTULO 5. ACTIVIDADES A DESEMPEÑAR POR EL QUÍMICO ANALISTA EN MICROBIOLOGÍA

El Químico analista tiene la responsabilidad de evaluar y controlar que ningún material, componente o producto terminado cuente con carga microbiana que se encuentre fuera de las especificaciones establecidas. Para poder cumplir con esto, el analista microbiólogo debe de cumplir con actividades específicas, los cuales se desglosan a continuación:

- a. Establecer un programa de análisis en donde se tienen que cubrir:
 - Materia prima
 - Graneles de maquilador (en caso que la empresa cuente con maquiladores)
 - Graneles fabricados en la planta.
 - Agua de proceso (utilizada para la fabricación de los productos)
 - Componentes en los que se encuentra contenido el producto (Ejemplo: envases, tapas, cajas, etc.).
 - Producto terminado.
 - Medio ambiente del área de manufactura y áreas donde es acondicionado el producto final.
 - Alimentos provenientes del comedor proporcionado por la empresa.
- b. Llevar a cabo correctamente los procedimientos para el análisis microbiológico establecido por las instituciones encargadas de la normalización de los procesos. (NOM-089, NOM-027, NOM-112, NOM-092, NOM-113).
- c. Preparación del material estéril necesario para los análisis microbiológicos.
- d. Preparación de medios de cultivo.
- e. Disposición y manejo de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI).
- f. Lectura de resultados de los análisis en tiempos establecidos.
- g. Aislamiento de microorganismos recuperados de los análisis.
- h. Tener documentado en bitácoras todos los análisis que lleve a cabo así como los resultados de los mismos, mediante buenas prácticas de documentación.
- i. Realizar una investigación para encontrar la fuente de contaminación del producto, así como establecer medidas correctivas.
- j. Expedir reportes de análisis al jefe inmediato.
- k. Capacitación del personal de la planta que entre en contacto directo con el producto para eliminar riesgos de contaminación por errores en la antisepsia.

CAPÍTULO 6. CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO EN EL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

Dada la naturaleza crítica de los análisis microbiológicos estos tienen que llevarse a cabo de una manera adecuada y confiable, deben de estar sometidos a ciertas condiciones de trabajo específicas así como el material auxiliar requerido para los mismos.

6.1 Equipo Mínimo Necesario

En la tabla No.6 se muestran los equipos mínimos que son necesarios para realizar los análisis microbiológicos de acuerdo a procesos estandarizados que brinden resultados confiables y reproducibles.

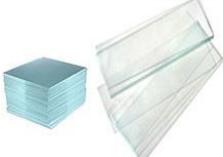
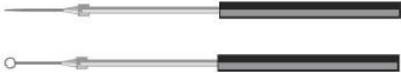
Tabla 6. Equipo necesario en el laboratorio de Microbiología

Equipo	Utilidad	Imagen
Autoclave	Esterilización mediante vapor de agua saturado bajo presión, destrucción microbiana por desnaturalización irreversible de enzimas y proteínas estructurales del microorganismo además de destruir formas esporuladas de las bacterias. (Cerra , Fernandez , Horak , Lagomarsino , Torno, & Zarankin , 2013)	
Campana de Flujo laminar	Equipo en el que se utiliza un ventilador para forzar el paso del aire hacia un filtro HEPA, barriendo la superficie de trabajo, las cuales protegen el material que se encuentran dentro de ellas liberándolas de partículas de hasta 0.1 μm (Garcia E. L., 2004)	
Microscopio	Ofrece una imagen ampliada del objeto a observar, imagen que a su vez es aumentada por el ocular. (Garcia V. , 2004)	
Incubadoras (25°C y 35°C)	Es un equipo cerrado en el que se puede controlar la temperatura, humedad y otras condiciones para el desarrollo de un cultivo microbiológico. (Organización Panamericana de la Salud, 2005)	
Balanza analítica	Instrumento que se utiliza para medir el peso de una sustancia o cuerpo, en control de calidad es utilizada para pesar los distintos componentes para un mezcla en proporciones definidas y determinar peso específico. (Organización Panamericana de la Salud, 2005)	
Refrigerador	Instrumento utilizado para la conservación de materiales utilizados en el laboratorio como reactivos, medio de cultivos, cepas, etc. (Organización Panamericana de la Salud, 2005)	

6.2 Materiales Auxiliares requeridos en el laboratorio.

En la tabla No. 7 se desglosan los materiales mínimos que son necesarios para realizar los análisis microbiológicos en el laboratorio de control de calidad

Tabla 7. Materiales Auxiliares necesarios en el laboratorio de Microbiología

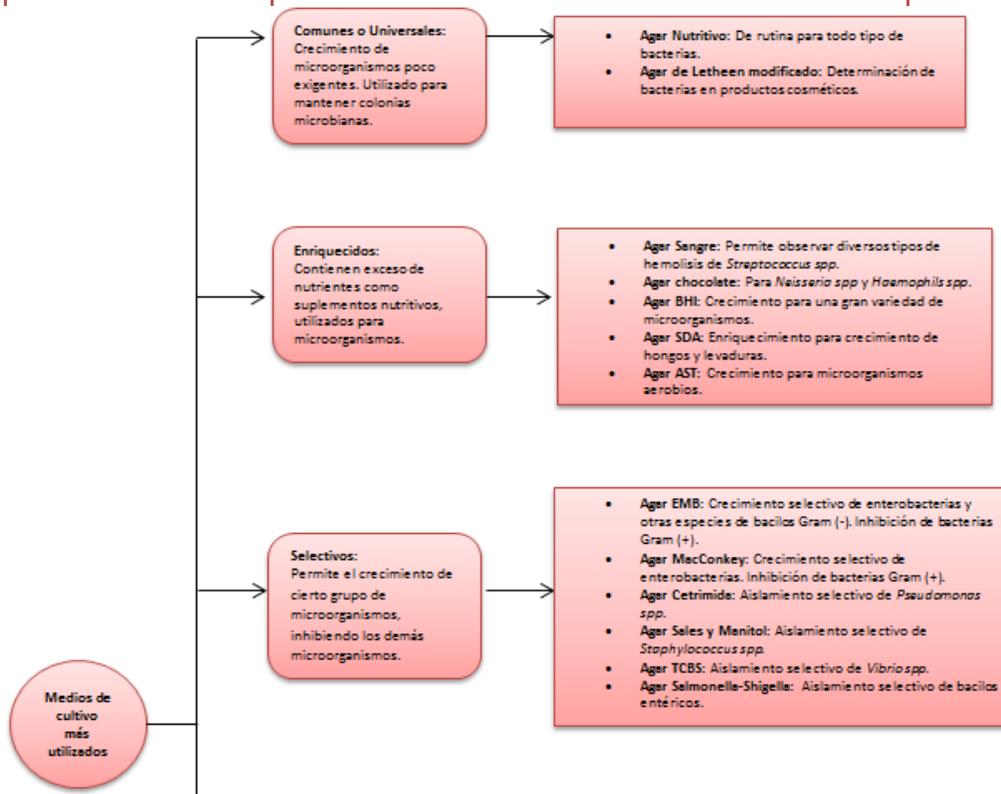
Tipo de material	Utilidad	Imagen
Pipetas de vidrio o Pipetas automáticas con puntas intercambiables	Son utilizadas para suministrar cantidades definidas y exactas de fluidos, soluciones y mezclas. (Organización Panamericana de la Salud, 2005)	
Botellas de dilución	Son utilizados para preparación de diluciones en serie, para realizar análisis microbiológicos cualitativos. (El crisol, 2010)	
Porta Objetos y Cubre Objetos	En ellos se disponen objetos para su observación en el microscopio.	
Tubos de ensayo	Se emplean como recipientes de medio de cultivo: sólidos, semisólidos, líquidos y pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos.	
Cajas Petri de vidrio o plástico desechables.	Son utilizadas como recipientes de medios de cultivo para el desarrollo, crecimiento y aislamiento de microorganismos.	
Mechero de Bunsen	Permite obtener una zona aséptica de trabajo de 15 cm, así como la esterilización de asas microbiológicas y materiales que entren en contacto directo con la muestra (Ejemplo: pinzas, espátulas, etc.)	
Asas Microbiológicas y Micológicas	Se utiliza para sembrar microorganismos en medios de cultivo y pruebas bioquímicas, estas pueden ser circulares o en punta.	

Matraz Erlenmeyer

Útiles para la preparación de soluciones, reactivos y medios de cultivo.



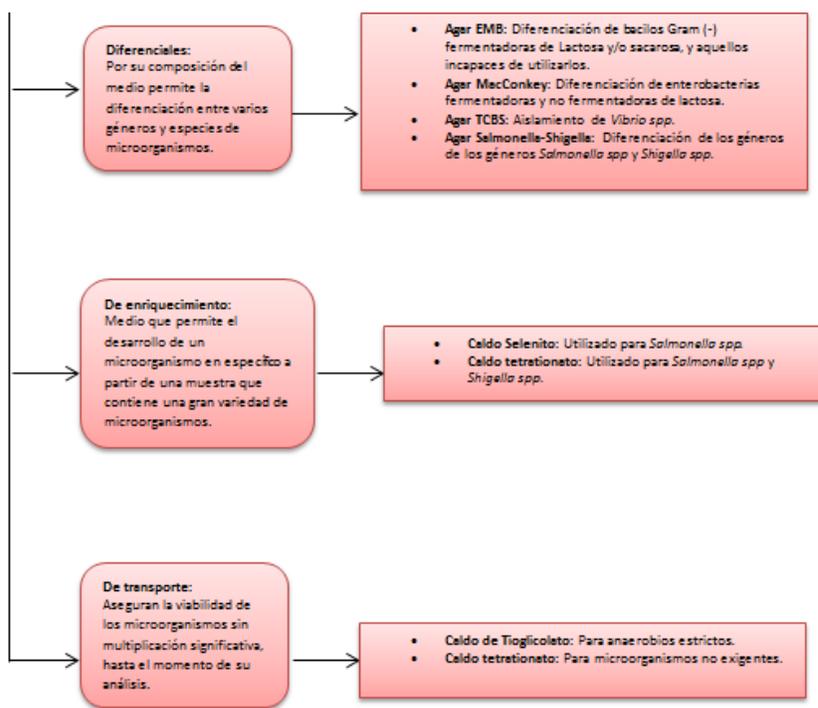
6.3 Medios de cultivo



utilizados

Para realizar el cultivo, crecimiento, aislamiento y diferenciación de diferentes tipos de microorganismos, es necesario utilizar diversos medios de cultivo ideales para cada tarea a realizar. Los medios de cultivo que son más comúnmente utilizados en el control de calidad microbiológico se muestran en la figura No. 5. (Espinosa, 2001)

Figura 5. Clasificación de medios de cultivo (Casado González, Torruco Cabezas , & Medina Anguita , 2012)



6.4 Tinciones Microbiológicas.

Para poder identificar al agente microbiano presente en el cosmético de análisis, es necesario realizar tinciones microbiológicas que nos permitan, observar su morfología y agrupación en el microscopio óptico, donde posteriormente se encontrará la posible fuente de contaminación de la muestra.

6.4.1 Tinción de Gram

Esta tinción es una de las más importantes en el área de la Microbiología, ya que forma parte de las pruebas primarias de identificación bacteriana. Esta tinción es diferencial y nos permite observar e identificar la morfología además de la agrupación de las bacterias y levaduras. Gracias a esta tinción es posible clasificar las bacterias en dos grupos: Bacterias Gram (+) y bacterias Gram (-).

En la Figura No. 6 se describe el procedimiento a seguir para esta tinción y en la figura No. 7 se muestran ejemplos de bacterias teñidas con la tinción de Gram.

Procedimiento y Reactivos utilizados:

- Cristal violeta 1% en solución de oxalato de amonio 0.85%.
 - Lugol (1g yodo/2g yoduro de potasio) en 300 ml de agua destilada.
 - Solución Alcohol- Acetona (500 ml alcohol etílico/ 300 ml acetona).
 - Safranina 0.25% en 10 ml de alcohol etílico y 1000 ml de agua destilada.
- (Química F. d., 2015) (UAM, 2004)

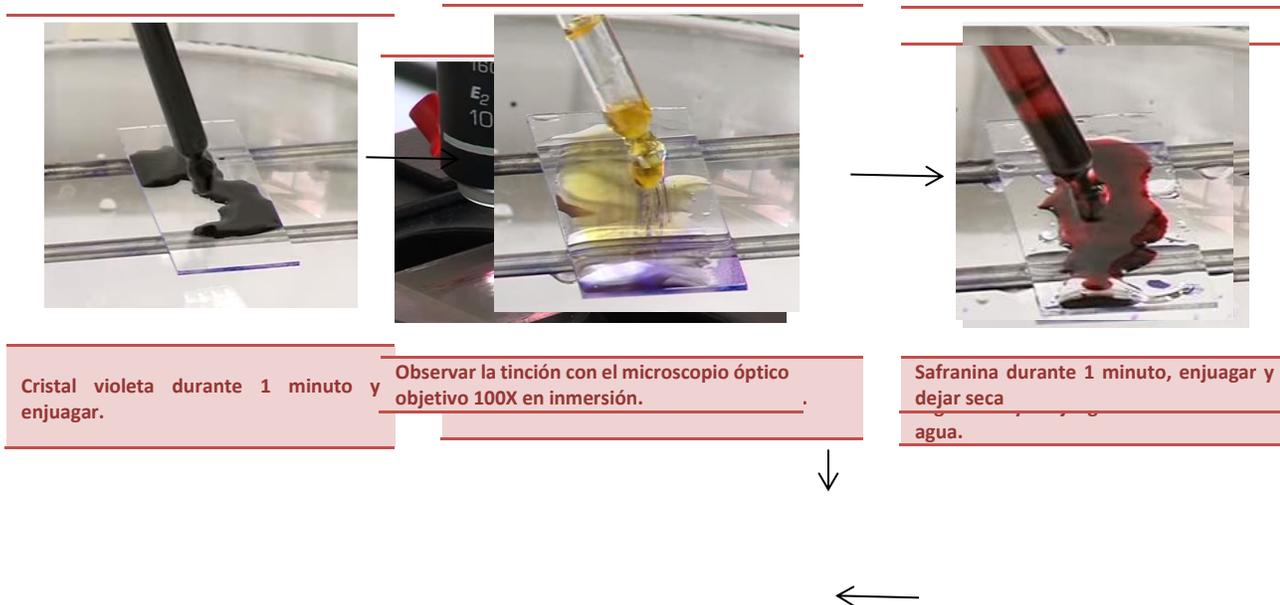


Figura 6. Diagrama de procedimiento para tinción de Gram (Sevilla, 2014)

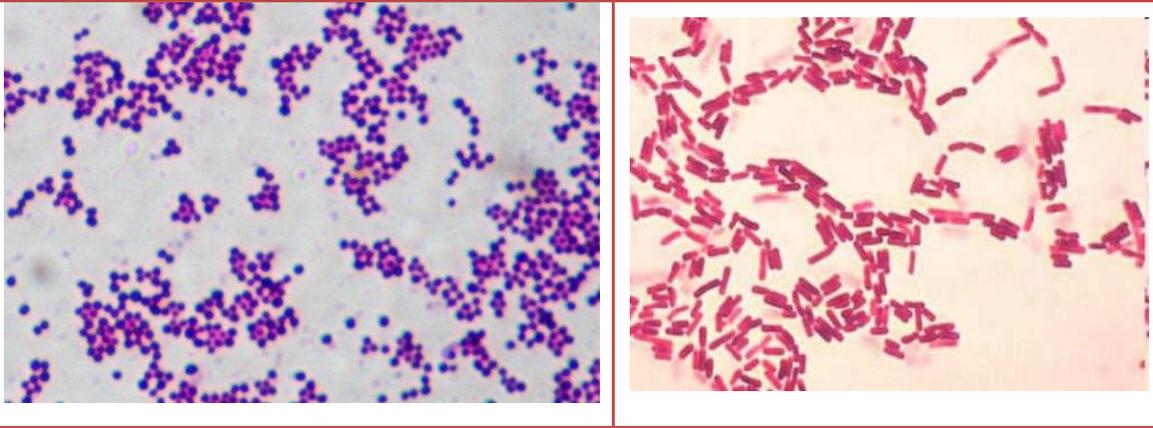


Figura 7. Ejemplos de bacterias teñidas con tinción de Gram.
Izquierda: Bacteria Gram (+) *Staphylococcus aureus* (Coast, 2016)
Derecha: Bacteria Gram (-) *Bacillus coagulans* (Pizabarro , 2008)

6.4.2 Tinción Shaeffer-Fulton.

Esta tinción es utilizada para la visualización de endósporas, estas son las formas de resistencia de algunas bacterias, esta tinción ayuda a la identificación de bacterias que presenten estas formas de resistencia. En la figura No. 8 se muestra el diagrama de procedimiento para la tinción Shaeffer-Fulton y en la figura No. 9 se presenta una visualización de una bacteria teñida con esta tinción respectivamente.

Procedimiento y Reactivos utilizados:

- Verde de malaquita al 5%.
 - Con emisores de vapor de agua 10 minutos, o bien colocar el colorante en un papel filtro encima del portaobjetos y calentar con el mechero directamente en tiempos intermitentes de 5- 10 segundos por 10 minutos, agregando más colorante para evitar que la preparación se seque.
 - Dejar enfriar la preparación para después lavar con agua.
- Safranina 0.5% (1 minuto). (Universidad Nacional Autónoma de México, 2015)

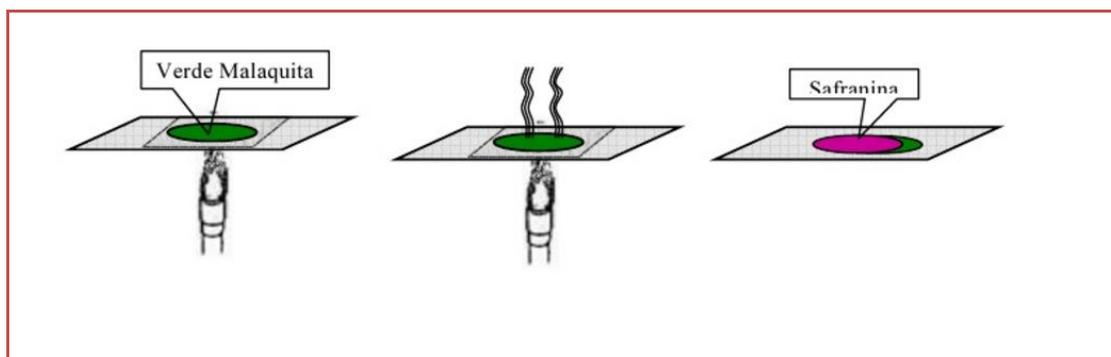


Figura 8. Diagrama de procedimiento para tinción de Shaeffer-Fulton (biológicas, 2011)

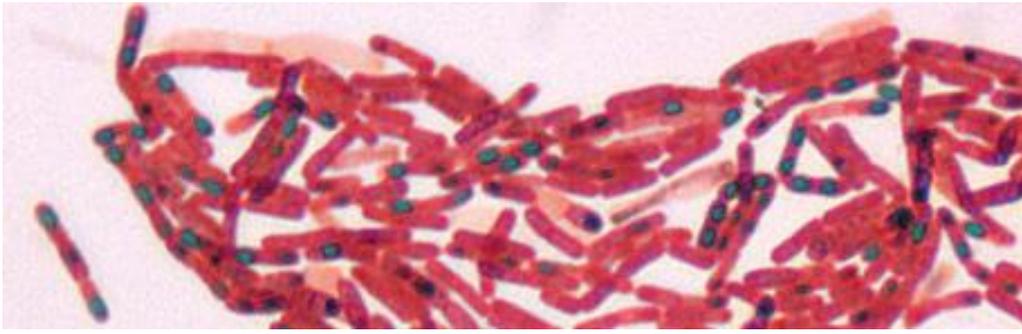


Figura 9. *Bacillus sp*, visualizado con la técnica de tinción para endosporas Shaeffer-Fulton. (Todar, 2012)

6.4.3 Tinción de azul de algodón de lactofenol

Esta tinción es utilizada para observar las principales estructuras de hongos filamentosos, el cual nos ayuda para su identificación. En la figura No. 10 se muestra el diagrama de procedimiento para esta tinción y en la figura No.11 se presenta un ejemplo de la visualización de la morfología con la tinción de azul de algodón.

Procedimientos y Reactivos utilizados:

- Cortar un segmento de cinta adhesiva y colocarlo en asa micológica.
- Colocar una gota de Azul de algodón en un portaobjetos.
- Con el lado adhesivo de la cinta, tocar la parte superior del hongo filamentososo.
- Colocar la cinta sobre el porta objetos y agregar otra gota de azul de algodón
- Poner un cubre objetos sobre la preparación.

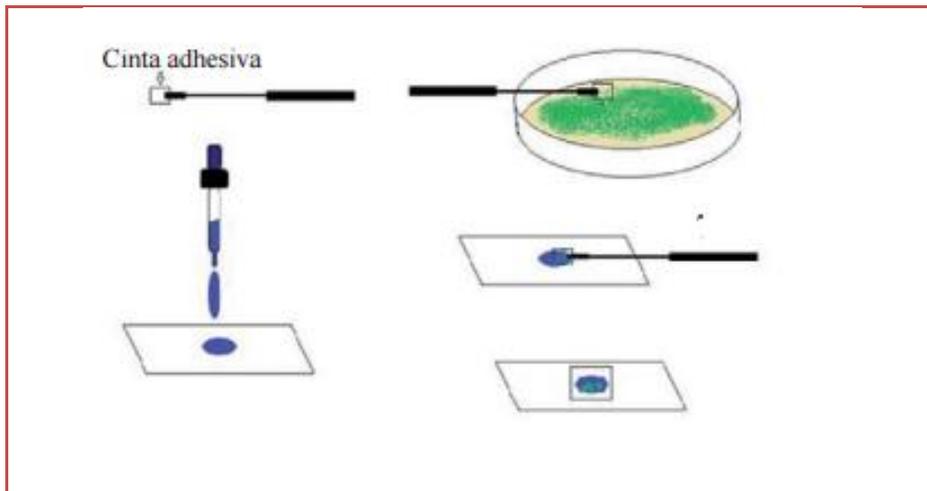


Figura 10. Diagrama de procedimiento para tinción de azul de algodón lactofenol. (López-Jácome, Hernández Durán, Colín Castro, Ortega Peña, Cerón González, & Franco Cendejas, 2014)



Figura 11. *Mucor spp.*, Tinción de azul de algodón lactofenol. (López-Jácome, Hernández Durán, Colín Castro, Ortega Peña, Cerón González, & Franco Cendejas, 2014)

6.5

Limpieza y

desinfección

Para llevar a cabo los análisis microbiológicos de una manera adecuada es necesario controlar el ambiente de trabajo para evitar posibles contaminaciones presentes. Por ello son utilizados procesos de limpieza y desinfección de las superficies, equipos y áreas donde serán manipuladas las muestras y se realizarán los análisis. Entendiéndose como limpieza: Proceso para eliminar o remover la suciedad de las superficies, equipos y áreas, como el polvo, grasa, líquidos, etc. Para esto son utilizados principalmente detergentes que eliminan el tipo de sustancia o suciedad presente y que no alteren la superficie de trabajo. (Gutiérrez de Gamboa & Rossi Devivo, 2001)

La limpieza de la superficie debe realizarse antes de la desinfección para que al eliminar la suciedad y los agentes desinfectantes actúen correctamente.

La desinfección es un proceso en el que se lleva a cabo la destrucción o eliminación de las formas vegetativas de los microorganismos remanentes pero no son eliminadas sus formas de resistencia. Esto se lleva a cabo mediante la utilización de agentes químicos aplicados sobre las superficies inertes. Los químicos utilizados deben ser los adecuados y tienen que estar a una concentración específica para que la desinfección se lleve a cabo correctamente. (Raúl, 2007)

A continuación en la Tabla No. 8 se mencionan los desinfectantes más utilizados en los laboratorios de control de calidad microbiológico, además de las concentraciones adecuadas que deben emplearse para realizar una desinfección óptima:

Tabla 8. Químicos desinfectantes más utilizados. (Negroni, 2009)

Tipo de desinfectante	Concentración	Mecanismo de acción
Alcohol etílico.	70% Si la concentración es mayor, ocurriría una deshidratación del microorganismo y son conservados en lugar de ser destruidos. Cuando la concentración es menor al 50% su actividad disminuye.	Consiste en la desnaturalización de las proteínas, por la inhibición de metabolitos esenciales. Para que este mecanismo se lleve a cabo debe de estar en concentración al 70% diluido en agua.
Cloruro de benzalconio.	1-2%	En solución acuosa tiene acción bactericida a tres niveles: alteración de la membrana celular, desnaturalización de proteínas e inactivación enzimática.
Yodo	1% en alcohol al 70%	Alteración de la síntesis protéica y las membranas celulares.
Cloro y compuestos del cloro	0.25%	Inactivación de las reacciones enzimáticas de ácidos nucleicos y desnaturalización de proteínas.

6.6 Esterilización

La esterilización es un proceso muy importante en el área de la microbiología porque en base a esto es posible trabajar libre de microorganismos remanentes que se pudieran encontrar en los materiales de trabajo, medios de cultivo, etc. Se define la esterilización como un proceso en el que se lleva a cabo la destrucción o eliminación al 100% de todos los microorganismos presentes, incluyendo sus formas de resistencia como hongos, esporas de bacterias y virus sin envoltura. Existen diversos métodos de esterilización, los cuales se utilizaran dependiendo del material o sustancia que se requiera esterilizar, esta clasificación se muestra en la figura No. 12:

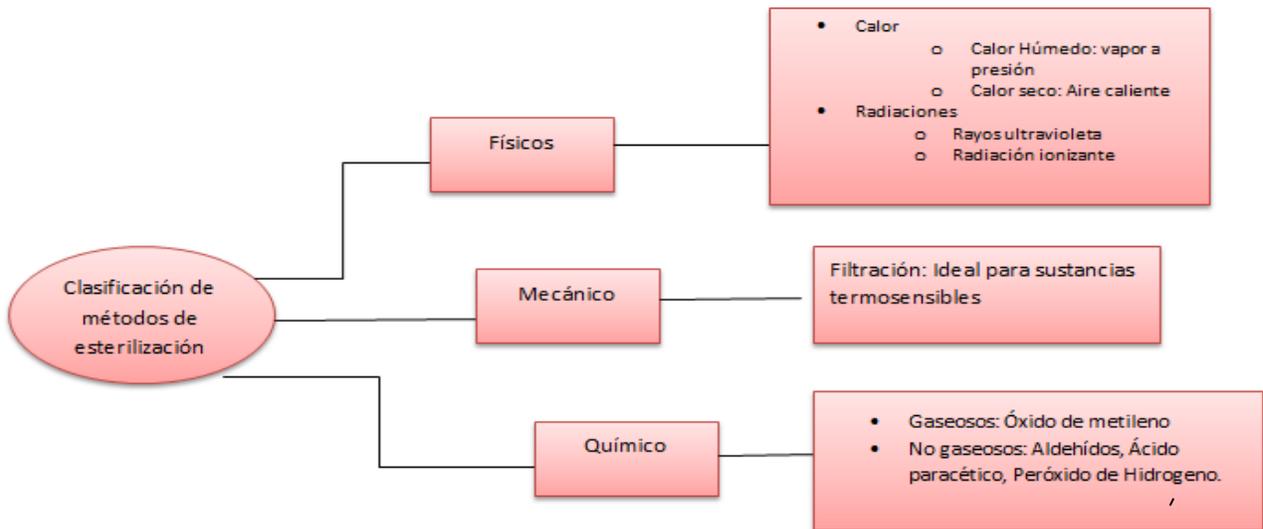


Figura 12. Clasificación de los diferentes métodos de esterilización del laboratorio de Microbiología. (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2006)

Para la obtención de resultados confiables en el área de microbiología es necesario trabajar dentro de una zona aséptica y llevar a cabo la manipulación de los materiales estériles siguiendo la técnica de asepsia adecuada.

La técnica aséptica tiene como objetivo evitar la contaminación de microorganismos perjudiciales durante el manejo de la muestra y la manipulación de medios de cultivo, dicha técnica es desglosada a continuación:

- Limpiar y desinfectar el área de trabajo.
- Contar con el material organizado.
- Crear un área aséptica con el mechero, donde se podrá manipular el material estéril. Esta área corresponde a un radio aproximado de 12 a 15 cm.
- Si se trabajara con asa bacteriológica o micológica, se necesita flamear en el mechero hasta que se encuentre al rojo vivo, para posteriormente dejar que se enfríe y poder manipular la muestra. Después de ser utilizada el asa se tiene que esterilizar de igual modo, esterilizar el asa del mango.
- Los demás materiales a utilizar como pipetas y puntas estériles deben de ser manipulados dentro del área aséptica, después de ser utilizados sumergirlos en un recipiente que contenga solución desinfectante.
- Al finalizar el trabajo en el área aséptica es necesario volver a desinfectar la superficie en donde se trabajó y lavar adecuadamente las manos.
(Urzua C. , 2014)

El término asepsia tiene como definición: El conjunto de métodos aplicados para la conservación de esterilidad, teniendo una antisepsia y una técnica aséptica adecuada. La antisepsia es un método utilizado para disminuir el número de microorganismos presentes en superficies vivas (cutáneas). (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2006)

6.7 Cepario

Para poder asegurar que los medios de cultivo están trabajando de manera adecuada, que la autoclave está llevando a cabo un proceso adecuado de esterilización, etc. Es necesario tener un cepario que cuente con las cepas más comúnmente encontradas en productos cosméticos ya sean cepas ATCC o bien cepas aisladas obtenidas de muestras contaminadas, y tomarlas como referencia para lo anterior mencionado, siempre y cuando estas cepas sean sometidas a toda la batería de pruebas bioquímicas primarias y secundarias para su correcta identificación, todo esto tiene que estar registrado en bitácoras de análisis.

Entre las cepas ATCC se encuentran:

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)
- *Escherichia coli* (ATCC 8739)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)
- *Aspergillus niger* (ATCC 10655)
- *Candida albicans* (ATCC 10231)
(Espinosa, 2001)

CAPÍTULO 7. CALIBRACIÓN DE EQUIPOS UTILIZADOS EN CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO

7.1 Definición.

Para poder obtener resultados confiables dentro del laboratorio de control de calidad, es necesario llevar a cabo la calibración de los equipos e instrumentos que nos aportan las lecturas de propiedades específicas para cada producto.

La definición de calibración según el VIM (Vocabulario Internacional de Metrología) es : *“Una operación que bajo condiciones especificadas establece, en una primera etapa, una relación entre los valores y sus incertidumbres de medida asociadas obtenidas a partir de los patrones de medida, y las correspondientes indicaciones con sus incertidumbres asociadas y, en una segunda etapa, utiliza esta información para establecer una relación que permita obtener un resultado de medida a partir de una indicación.”* (Centro Español de Metrología, 2012)

En otras palabras se define la calibración como: Operación que se realiza para comparar la respuesta de un instrumento con un estándar de propiedades conocidas bajo incertidumbres específicas, para detectar imprecisiones del instrumento y eliminar las mismas mediante correcciones al equipo hasta llegar a un resultado o lectura correspondiente al valor del estándar, dando validez y trazabilidad a la medición.

7.2 Equipos sometidos a calibración.

Es necesario contar con un programa de calibración de equipos con un intervalo de tiempo definido para cada instrumento, con esto aseguramos que se encuentran en condiciones óptimas de funcionamiento y que los análisis realizados en el laboratorio son válidos y reproducibles.

Esta calibración debe de ser realizada por personal que este certificado o bien por una empresa externa que igualmente se encuentre certificada.

Para el correcto mantenimiento de los equipos, el personal del laboratorio tiene que realizar verificaciones diarias para asegurarse que el equipo se encuentra funcionando adecuadamente y en caso de no ser así implementar las medidas correctivas necesarias.

A continuación en la tabla No. 9 se desglosan los equipos o instrumentos a los cuales es indispensable realizar una calibración periódica dentro del laboratorio de control de calidad.

Tabla 9. Equipos sometidos a calibración (Espinosa, 2001)

Equipo o instrumento	Especificaciones	Cuidados de seguridad
Autoclave	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura uniforme: 121°C por 15 minutos. • Cumplir con la presión de esterilización 1 atm o 15 lb que debe mantenerse por todo el periodo de esterilización 	<ul style="list-style-type: none"> • Verificar el que nivel de agua este cubriendo la resistencia de calentamiento. • Verificar que las perillas estén bien ajustadas. • Debe de contar con válvulas de seguridad de presión.
Horno o estufas	<ul style="list-style-type: none"> • Rango de temperatura: 30 a 260 °C • Tiempo de calentamiento: De temperatura ambiente a 100°C por 20 minutos 	<ul style="list-style-type: none"> • No operar la estufa en el rango máximo de temperatura. • No colocar material donde obstruya el paso de aire.
Balanzas	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad • Repetitividad • Linealidad • Tiempo de respuesta • Voltaje 	<ul style="list-style-type: none"> • La campana siempre debe de permanecer cerrada • No mover la balanza • Colocarse en mesa firme y libre de vibraciones.
Potenciómetro	<ul style="list-style-type: none"> • Rango • Resolución • Precisión • Desviación • Electrodo 	<ul style="list-style-type: none"> • El electrodo siempre tiene que estar húmedo. • Evitar la exposición prolongada con el agua destilada.
Campana de flujo laminar	<ul style="list-style-type: none"> • Filtros HEPA • Lámpara • Eficacia del ventilador 	<ul style="list-style-type: none"> • Evitar corrientes de aire. • Debe de tener conexión a tierra. • El piso donde se encuentre deberá ser plano. • Limpiar las superficies, rotando desinfectantes.
Incubadoras	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidad de temperatura $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ • Humedad Mínima 75-85% 	<ul style="list-style-type: none"> • Conexión a tierra. • Verificar resistencia. • Revisar el termostato.
Refrigeradores	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura 4°C • Correcto cierre de las puertas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Limpiarse y descongelarse cada 3 meses. • Verificar que la temperatura sea adecuada.
Microscopios	<ul style="list-style-type: none"> • Oculares por 10X • Objetivos móviles: 4X, 10X, 40, 100X. Condensador • Mecanismos de enfoque. 	<ul style="list-style-type: none"> • Usar un tomacorriente con línea a tierra.

CAPÍTULO 8. VALIDACIÓN DE MÉTODOS REQUERIDOS EN CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO

Para poder demostrar en un sentido estadístico que el producto final, la estabilidad del proceso con el cual este se produce y los análisis de control de calidad son confiables es utilizada una herramienta muy importante llamada validación. Esta misma es requerida en las auditorías por instituciones como: FDA, ISO 9000, FAO así como las buenas prácticas de manufactura (Good Manufacturing Practice, GMP) y las buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).

La validación es definida por la FDA como: *“La evidencia documentada que provee un alto grado de seguridad en que un proceso específico producirá en forma consistente, un producto con las especificaciones y atributos de calidad predeterminados”* (Soledad Rodríguez, 2009)

Deben de ser sometidos a un proceso de validación los siguientes aspectos dentro de la industria:

- Métodos Analíticos.
- Sistemas de información.
- Sistemas críticos.
- Limpieza.
- Procesos.
- Instalaciones.
- Equipo.
- Personal.

A través de la validación mediante una adecuada documentación se puede demostrar que el procedimiento opera de una manera adecuada en el cual se recogen y analizan evidencias que demuestran la eficiencia del proceso.

Con el proceso de validación se puede asegurar que el producto cuenta con todos los atributos y características con las que fueron desarrolladas en primera instancia y que estas se mantengan lote a lote a través de la producción.

Primeramente se evalúan los recursos que son empleados para la producción del producto como el funcionamiento de los materiales empleados, los equipos o instrumentos utilizados dentro del proceso productivo como en los métodos de análisis.

El objetivo de la validación es encontrar variaciones potenciales que pueden ocurrir durante todo el proceso de fabricación del producto. Todos los datos arrojados en los procesos de producción y los procesos de control de calidad deben de estar bien documentados en bitácoras que pueden ser electrónicos o físicos siguiendo las buenas prácticas de documentación.

8.1 Características Analíticas en la validación de un método analítico.

A continuación en la tabla No. 10 se desglosan las características que se encuentran incluidas en los métodos de validación:

Tabla 10. Características Analíticas típicas en la validación de un método analítico (Oficina de las Naciones Unidas, 2010)

Característica	Definición
Especificidad o Selectividad	Capacidad del método documentado ya establecido, para distinguir, identificar o cuantificar el analito de interés en presencia de otras sustancias que puedan causar interferencia contenidas en la muestra.
Límite de detección	Concentración mínima del analito que puede ser detectado o cuantificado mediante un método determinado, bajo las condiciones de trabajo establecidas.
Exactitud	Medición de la cercanía del valor aceptado de referencia entre el valor obtenido mediante la aplicación del método de análisis, cierto número de veces, realizado con la misma muestra, por el mismo analista y con el mismo equipo.
Linealidad	Cualidad del método establecido para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito que se encuentra en la muestra problema.
Precisión	Mide la cercanía (grado de dispersión) entre los resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones de un mismo analito, mediante múltiples muestreos de una misma clase de muestra, bajo condiciones establecidas en el método, las condiciones en la que es medida la precisión deben ser condiciones repetibles y reproducibles. Con la precisión se puede ver reflejados los errores aleatorios producidos al utilizar el método de interés.
Condiciones repetibles - Repetibilidad- Repetitividad	Es la determinación de la precisión obtenida mediante las mismas condiciones de operación, bajo un intervalo corto de tiempo, es decir el mismo día, realizadas estas mediciones por el mismo analista, mismo instrumento o equipo y la misma clase de muestra.
Condiciones reproducibles - Reproducibilidad	Determinación de la precisión mediante diferentes condiciones de operación: diferentes laboratorios, analistas, intervalos de tiempo y equipos. Siguiendo el mismo método de análisis con la misma clase de muestra.
Robustez	Capacidad del método analítico de no verse afectado significativamente por variaciones intrínsecas o extrínsecas del método.

8.2 Calificación de equipos o instrumentos de laboratorio.

Como primera parte o etapa inicial para realizar la validación de métodos analíticos, es necesario realizar la calificación de los equipos que intervendrán en todo el desarrollo del método analítico con la finalidad de comprobar y documentar que todos los equipos fueron instalados adecuadamente y cumplen con sus funciones correctamente, esto es para poder asegurar la obtención de resultados esperados y confiables. (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010)

8.2.1 Etapas para la calificación de equipos.

- **Calificación de diseño:** Especificaciones operacionales y funciones del equipo.
- **Calificación de instalación:** Evidencia documentada de la correcta instalación del equipo, para su correcto uso.
- **Calificación de operación:** Documentación de los valores de operación correctos del equipo.
- **Calificación de desempeño:** Verificación de rangos de funcionamiento óptimo. (Aguirre Mejía, 2015)

CAPÍTULO 9. CONTROL DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO.

Es necesario contar con controles para que las condiciones de trabajo en las que es manipulado el producto sean las óptimas, esto es para evitar la contaminación microbiana a lo largo del proceso de producción desde el desarrollo del granel, el etiquetado, el acondicionamiento a producto terminado, hasta los análisis para control de calidad.

Teniendo estas precauciones se podrá controlar en su mayor parte la contaminación por ambiente o manipulación incorrecta por parte del personal, tanto en producción como en control de calidad.

A continuación se desglosan los elementos o factores a controlar cuando se llevan a cabo los procesos de fabricación del producto y los análisis de control de calidad microbiológico.

9.1 Control ambiental

Los cuartos limpios son zonas delimitadas por paredes, techo, piso y accesos en los cuales se tienen un estricto control sobre la cantidad de partículas presentes en el aire. En los cuartos limpios se llevan a cabo: La preparación de los productos, acondicionamiento del producto final, análisis de control de calidad. Como parte de los requerimientos de los cuartos limpios se tiene que llevar una medición programada en diversos puntos del área del cuarto, para poder identificar los factores que contribuyen en los procesos de contaminación.

Para poder determinar la calidad del aire en todas las zonas donde es manipulado el producto son utilizados los métodos que se describen en la Tabla No.11:

Tabla 11. Métodos utilizados para determinar la calidad del aire en zonas de trabajo. (Ramírez Trejo , 2009)

Método	Características
Sedimentación	Consiste en la colocación de cajas petri abiertas con medio de cultivo adecuado, en zonas escogidas para el muestreo, dejándolas en el ambiente aproximadamente 2 horas para su posterior incubación.
Recogida en medio acuoso	Hacer fluir un volumen de aire determinado a través de una solución isotónica, para la determinación cuantitativa de microorganismos.
Filtración	El aire es aspirado a través de una membrana de policarbonato en el cual las partículas se depositan, estas partículas pueden ser removidas fácilmente por agitación en líquidos para su posterior cultivo.
Impactación	El aire, aspirado por una bomba de vacío que forma parte del muestreador, pasa a través de un orificio y es dirigido a la superficie del medio de cultivo contenido en una placa adecuada.

9.2 Control de personal

Una de las principales fuentes de contaminación de los productos durante el proceso de fabricación e interferencias en el análisis de control de calidad microbiológico es la higiene del personal, a través de la contaminación por manos y cabello.

El objetivo principal de tener un control del personal es el disminuir esta forma de contaminación a su vez se deben de realizar periódicamente (cada 2- 4 meses) estudios médicos como: coproparasitoscópico, reacciones febriles y exudados faríngeos ya que la saliva, al toser o estornudar son una fuente importante de transmisión de patógenos. Para poder evitar la contaminación por el personal es necesario contar con ciertas medidas, una de las más importantes es la utilización del equipo de protección las cuales se describen a continuación en la Tabla No. 12:

Tabla 12. Equipo de protección personal (Del Rayo Salinas, 2009)

Equipo	Características	Imagen
Cofia	Este puede ser de tela o desechable, es utilizada para evitar la contaminación de los productos por el cabello	
Bata de laboratorio	Controlar la contaminación por la ropa que tiene contacto con el medio exterior, nos permite mantener un ambiente de trabajo controlado.	
Cubrebocas	Previene la contaminación del producto por saliva, mucosidad o respiración, además de brindar protección al personal por inhalación de sustancias o microorganismos.	
Guantes desechables	Evita contaminación del producto por contacto directo con las manos, además de brindar protección a las manos de sustancias o contacto directo con microorganismos.	
Calzado	Seguridad contra impactos o salpicaduras	

9.2.1 Métodos de control para el personal

9.2.1.1 Hisopado de manos

Esta técnica es utilizada para asegurarse que el personal lleva a cabo adecuadamente el lavado de manos, esta tarea debe de realizarse periódicamente de acuerdo a los programas establecidos por la empresa.

Método:

- Tomar un hisopo estéril y sumergirlo en un tubo de tapa rosca que contenga 10 ml de solución diluyente (solución amortiguadora de fosfatos) también estéril, retirando el exceso de líquido en las paredes del tubo.
- Frotar con el hisopo húmedo la superficie de la palma se la mano como también la superficie interna de los dedos y las uñas. (realizar esto en las dos manos)
- Regresar el hisopo al tubo que contiene la solución diluyente, rompiendo la parte que entro en contacto con los dedos del analista.
- Transferir 1 ml de la dilución a cajas petri estériles, para agregar medio de cultivo determinado como: Agar Soya Trypticaseina (AST) , Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV) y Agar dextrosa Sabouraud (ADS), de acuerdo a los establecido en las normas: NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa, NOM-113-SSA1-1994 Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa y NOM-111-SSA1-1994 Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. (Facultad de Química UNAM, 2012)

Cálculo:

- Calcular el número de colonias por mano o por las dos manos, multiplicado por el volumen de diluyente utilizado (10 ml) y dividirlo entre 2 en caso de haber muestreado ambas manos, reportando como UFC/superficie de mano. (Facultad de Química UNAM, 2012)

Límites permisibles:

Cuenta total de Mesofílicos aerobios: < 3 000 UFC/manos o < 1 500 UFC/mano

Cuenta de coliformes totales < 10 UFC/manos o < 5 UFC/mano

Cuenta de hongos y levaduras < 10 UFC/manos o < 5 UFC/mano

(Facultad de Química UNAM, 2012) (NOM-093-SSA1-1994,1995)

9.2.1.2 Cultivo para el cabello

Este monitoreo debe de realizarse periódicamente de acuerdo a la normatividad interna, es utilizada para detectar deficiencias en la higiene del personal y asegurar el correcto uso de la cofia dentro de las zonas de trabajo.

Método:

- Obtener el cabello desde la raíz que se encuentre visible fuera de la cofia, con pinzas estériles.
- Colocarlo sobre una caja Petri con agar AST y agar ADS.
- Incubar a 37°C por 24 h para el agar AST y 5 días a 25° C para el agar ADS.

9.3 Control de equipos y superficies:

El tener bajo control el estado de las superficies de trabajo como en los equipos que se utilizan ya sea en el área de producción o en el laboratorio de control de calidad es muy importante puesto que permite determinar la posible contaminación por agentes biológicos de los instrumentos de trabajo, la maquinaria, y el mobiliario. Que por sus características puedan convertirse en reservorios de agentes biológicos.

9.3.1 Placa de contacto o placas RODAC

Las placas de contacto o placas RODAC (*Replicate organism detection and counting*), contiene medio de cultivo adecuado, esta se coloca sobre la superficie a muestrear en forma directa, manteniéndose inmóvil y presionándola contra la superficie, dando el tiempo y temperatura de incubación dependiendo del medio de cultivo utilizado. (Departamento de Ciencias Biológicas, 2009)

9.3.2 Hisopado de superficies y equipos.

Método:

- Colocar una zona delimitada de 5 x 5 cm o 10 x 10 cm sobre la superficie o el equipo a muestrear.
- Tomar un hisopo estéril y sumergirlo en un tubo de tapa rosca que contenga 10 ml de solución diluyente (solución amortiguadora de fosfatos) también estéril, retirando el exceso de líquido en las paredes del tubo.
- Frotar con el hisopo húmedo la superficie delimitada en 3 sentidos diferentes: horizontal, vertical y oblicuo.
- Regresar el hisopo al tubo que contiene la solución diluyente, rompiendo la parte que entro en contacto con los dedos del analista.
- Transferir 1 ml de la dilución a cajas petri estériles, para agregar medio de cultivo determinado como: Agar Soya Trypticaseina (AST) , Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV) y Agar dextrosa Sabouraud (ADS), de acuerdo a los establecido en las normas: NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa, NOM-113-SSA1-1994 Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa y NOM-111-SSA1-1994 Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. (Facultad de Química UNAM, 2012)

Cálculos:

- Contar todas las colonias que se desarrollen en las cajas, que serían hasta este momento UFC/ml, después se multiplica por el volumen de diluyente empleado y por último se divide entre cm^2 de la superficie. Los resultados se expresan como UFC/cm^2 . (Facultad de Química UNAM, 2012)

Límites permisibles:

- ✓ Cuenta total de Mesofílicos aerobios: $< 400 \text{ UFC}/\text{cm}^2$
 - ✓ Cuenta de coliformes totales: $< 200 \text{ UFC}/\text{cm}^2$
 - ✓ Cuenta de hongos y levaduras: $< 150 \text{ UFC}/\text{cm}^2$
- (Facultad de Química UNAM, 2012)

CAPÍTULO 10. CONSERVADORES UTILIZADOS EN COSMÉTICOS

10.1 Definición de conservadores.

Los conservadores son sustancias químicas con actividad antimicrobiana, que son agregados a los cosméticos durante el proceso de producción, cuya función es prevenir el crecimiento de microorganismos durante su fabricación, almacenaje y uso cotidiano por parte del consumidor. (Leranoz, 2002)

Los conservadores evitan que los microorganismos se multipliquen hasta alcanzar concentraciones que puedan causar daño al consumidor.

Es importante saber elegir el tipo de conservador que se utilizara para cada tipo de cosmético, ya que de esto depende el tipo de formulación para cada cosmético, las propiedades fisicoquímicas del granel, método de fabricación, tipo de envase destinado para el producto final, forma en la que se aplica el producto y que cumpla con todos los aspectos de seguridad toxicológica. Las características que debe de reunir el conservador ideal se enlistan a continuación:

- Amplio espectro de actividad antimicrobiana.
- No debe de producir reacciones adversas de sensibilidad.
- Disponibles tanto para vehículos acuosos, como oleosos.
- Estabilidad ante cambios bruscos de pH y temperatura durante todo el tiempo de vida del producto.
- Estructura química conocida.
- Compatibilidad con la formulación.
- Compatibilidad con el componente.
- No debe de alterar las características organolépticas del cosmético.
- Económico.

(Rivera Mejia & Sagastizado Mendez , 2014)

10.2 Tipos de conservadores.

Existen diversos tipos de conservadores de acuerdo a su estructura química divididos en familias, las cuales se muestran a continuación en la tabla No. 13:

Tabla 13. Principales familias de conservadores utilizados en cosméticos (Lemmel, 2008)

Familia de conservador	Componentes
Ácidos orgánicos	<ul style="list-style-type: none"> Ácido benzoico y sus sales (Benzoato de sodio, potasio o calcio). Ácido dehidroacético y sus sales (Dehidroacetato de sodio). Ácido sorbico y sus sales. (Sorbato de sodio, potasio o calcio). Ácido p-hidroxibenzoico y sus sales, sus ésteres (parabenos) Ácido salicílico y sus sales (Salicilato de Calcio, Magnesio, Potasio, Sodio).
Alcoholes	<ul style="list-style-type: none"> Alcohol bencílico. Alcohol 2,4-dicloro-diclorobencílico.
Sales de amonio cuaternario	<ul style="list-style-type: none"> Cloruro de Benzalconio. Cloruro de cetrimonio.
Derivados fenólicos	<ul style="list-style-type: none"> 2-fenoxietanol. 2,4 tricloro 2-hidroxifeniléter (Triclosán)
Aldehídos y formadores de formaldehído	<ul style="list-style-type: none"> Glutaraldehído. Formaldehído. Imidazolidinilurea. Diazolidinilurea. 5- bromo-5-nitro-1,3-dioxano, 2-bromo-2-nitro-1,3 Propanodiol. Dimetilol dimetil hidantoína.
Compuestos mercuriales	<ul style="list-style-type: none"> Nitrato de fenilmercurio.
Isotiazolinonas	<ul style="list-style-type: none"> 5-cloro-2-metil-3,4-isotiazolinona. 2-metil-3,4-isotiazolinonas.
Diguanidinas	<ul style="list-style-type: none"> Clorhexidina. Hexetidina.
Grupos diversos	<ul style="list-style-type: none"> 2-dibromo-2,4-dicianobutano. 3- yodo-2-propinilbutilcarbamato (PBC). Metildibromoglutaronitrilo. 7-etilbiciclooxazolidina. 4,4-dimetil-1,3-oxazolidina. Clorfenesina. Hexamidina diisetionato
N-óxidos de piridina	<ul style="list-style-type: none"> Piritionato de zinc. Pirictone olamina.

Para poder seleccionar el conservador que se utilizará en el cosmético, es importante saber que contendrá la formulación del mismo, además de la forma de presentación y aplicación, así como saber con cuales tipos de microorganismos tendrá actividad. En la Tabla No. 14 se muestran del modo de actividad de conservadores utilizados en productos cosméticos.

Tabla 14. Modo de actividad antimicrobiana de conservadores (Lemmel, 2008)

Modo de acción	Conservadores con esta actividad
Amplio espectro de actividad (Bacterias, hongos y levaduras)	<ul style="list-style-type: none"> • Nitrodioxanos. • Clorobutano. • Cloruros de polihexametilenbiguanido. • Ácido dehidroacético. • Formaldehído. • Isotiazolinonas. • Ácido salicílico. • Fenilmercurios. • Glutaraldehído.
Amplio espectro de actividad (mayor efectividad contra bacterias)	<ul style="list-style-type: none"> • Nitropropanodíoles. • Clorhexidinas. • Azoniadamantanos. • Imidazolidinilureas. • Fenoxietano
Amplio espectro de actividad (mayor efectividad contra hongos y levaduras)	<ul style="list-style-type: none"> • Parabenos. • Alcoholes diclorobencílicos. • Sorbato de potasio. • Benzoato de sodio. • Óxido de piridinetiol.

10.3 Mecanismos de acción de conservadores.

Cada tipo de conservador que existe de acuerdo a la familia que corresponda tiene un mecanismo de acción determinado, en el cual casi todos los conservadores actúan en el bloqueo y transporte de energía mediante la desnaturalización de las proteínas o cambio en la permeabilidad de la membrana de los microorganismos.

A continuación se enlistan los principales mecanismos de acción que llevan a cabo los conservadores sobre los microorganismos:

- Daño en la membrana celular: Los ácidos orgánicos, alcoholes y las sales cuaternarias de amonio actúan dañando la estructura de la membrana, alterando el orden de los lípidos y proteínas presentes en dicha membrana produciendo interferencias en procesos metabólicos de energía y de transporte.
Los ácidos débiles como los parabenos, el ácido benzoico y el ácido hidroacético actúan interfiriendo en procesos metabólicos de energía y de transporte, pero estos alteran el potencial eléctrico y la permeabilidad de la membrana celular.
- Desnaturalización de proteínas: Los donadores de formaldehídos, aldehídos, alcoholes y derivados fenólicos, actúan en la agregación y precipitación de las proteínas de la membrana y citoplasma celular de los microorganismos.
- Modificación de grupos funcionales: Las isotiazolinonas, grupos diversos, etc. Son agentes que actúan alterando los grupos funcionales en las proteínas presentes en la membrana celular, centros activos enzimáticos y ácidos nucleicos. (Leranoz, 2002)

CAPÍTULO 11. MICROORGANISMOS COMÚNMENTE ENCONTRADOS EN COSMÉTICOS

A lo largo del proceso de fabricación existen puntos críticos de riesgo en donde el producto cosmético puede verse perjudicado a causa de la presencia de microorganismos patógenos, que pueden comprometer la seguridad del producto y por ende la seguridad del consumidor.

Existen diversos factores que permitan la adaptación y reproducción de los microorganismos en los productos cosméticos, en los cuales se encuentran:

- Falla del conservador.
- Utilización de un conservador no apto para el cosmético.
- Elevado contenido de agua en la formulación del producto.
- Productos biológicos contenidos en la formulación del producto que puedan servir como fuentes de energía para los microorganismos.
- pH favorable (dependiendo del tipo de microorganismo contaminante).
- Componente o envase que facilite el desarrollo de microorganismos.
- Temperatura de almacenamiento.
- La presión osmótica. (Garcés, 2009)

Ya cuando el microorganismo pudo adaptarse a las nuevas condiciones de crecimiento y ocurre un crecimiento exponencial de los mismos, el cosmético contaminado se ve afectado en sus propiedades físicas, debido a la presencia de estos microorganismos y sus productos metabólicos de desecho.

Los principales cambios que puede presentar el producto cosmético como consecuencia a la contaminación microbiológica son:

- Evidencia de crecimiento del microorganismo (presencia del hongo filamentoso o moho sobre el producto, presencia de turbidez en productos líquidos).
- Separación de fases en emulsiones.
- Pérdida de viscosidad.
- Cambios en el aroma del cosmético (presencia de mal olor).
- Deformación del contenedor del cosmético causado por fermentación.
- Cambio de color.
- Sedimentación de los materiales suspendidos. (Lemmel, 2008)

Los tipos de microorganismos aislados a partir de cosméticos pueden variar significativamente, dependiendo de: El tipo de cosmético, fuente de contaminación, tipo de envase, etc.

Pudiéndose encontrar hongos, levaduras y bacterias. A continuación en las Tablas 15 y 16, se presentan los tipos de microorganismos que con más frecuencia son aislados a partir de productos cosméticos:

Tabla 15. Bacterias más frecuentes encontradas en cosméticos (Lemmel, 2008)

Tipo de Bacteria	Ejemplos
Mesófilos aerobios (Indicadores de condiciones de manejo y eficiencia del proceso)	Incluyen los microorganismos capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno a una temperatura de 30 °C - 40°C.
Enterobacterias (En este familia incluye a los coliformes totales y fecales)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli.</i> • <i>Enterobacter sp.</i> • <i>Klebsiella pneumoniae.</i> • <i>Citrobacter sp.</i> • <i>Proteus sp.</i> • <i>Salmonella sp.</i> • <i>Shigella sp.</i>
Bacilos no fermentativos: gramnegativos	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas sp.</i> • <i>Burkholderia cepacia.</i>
Bacilos esporulados	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Clostridium sp.</i> • <i>Bacillus sp.</i>
Cocos Gram positivos	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Sthapylococcus sp.</i> • <i>Steptococcus sp.</i> • <i>Micrococcus sp.</i>

Tabla 16. Hongos filamentosos y levaduras más frecuentes aislados de cosméticos (Lemmel, 2008)

Tipo de microorganismo	Ejemplos
Hongos Filamentosos	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Aspergillus sp.</i> • <i>Penicillium sp.</i> • <i>Cladosporium sp.</i>
Levaduras	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida albicans.</i>

11.1 Aspectos generales de los microorganismos localizados en cosméticos.

11.1.1 Bacterias más frecuentes encontradas en cosméticos

11.1.1.1 Mesófilos aerobios:

En este grupo de microorganismos están incluidas todas las bacterias, hongos y levaduras, en cuyo desarrollo sea necesario la presencia de oxígeno y su temperatura óptima de crecimiento se encuentre en un rango de 30°C - 40°C. (Facultad de Química UNAM, 2015)

Los mesófilos comprenden la mayor parte de los microorganismos que pueden adaptarse, desarrollarse y reproducirse en animales de sangre caliente. Con el recuento de mesófilos aerobios se puede estimar la calidad sanitaria de la materia prima, del granel, y del producto terminado y la forma que el producto fue manipulado durante su proceso de producción. (Administración Nacional de Medicamentos Argentina, 2014)

Estos microorganismos son considerados una cuenta total, el cual un recuento elevado del mismo puede reflejar:

- La contaminación de la materia prima.
- Manipulación errónea durante el proceso de producción.
- La posibilidad de la presencia de patógenos.
- La alteración del funcionamiento del producto.

Ejemplos de Mesófilos aerobios:

- *Staphylococcus aureus*.
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus sp.*
- *Salmonella sp.*
- *Pseudomonas sp.*
- *Candida albicans*.
- *Aspergillus sp.*

11.1.1.2 Enterobacterias:

La familia *Enterobacteriaceae* es un grupo muy grande de bacterias Gram negativos, aerobios y aerobios facultativos; su localización habitual es el tubo digestivo como saprofitos. También pueden encontrarse en el suelo, el agua y la vegetación, así como en la flora normal del intestino de muchos animales (Puerta García & Mateos Rodríguez, 2010). A continuación en la Tabla No. 17 se muestran ejemplos de enterobacterias encontradas en cosméticos:

Tabla 17. Ejemplos de Enterobacterias encontradas en cosméticos (Navarra, 2004)

Espece Bacteriana	Descripción General
<i>Proteus spp.</i>	Bacterias en la flora intestinal y saprófita en agua y el suelo, pueden causar infecciones en vías urinarias, sepsis e infecciones en heridas. En el ámbito cosmético <i>Proteus mirabilis</i> puede causar conjuntivitis bacteriana.
* <i>Salmonella spp.</i>	Bacteria responsable de infecciones alimentarias como: Enteritis, fiebre entérica, septicemia primaria. Puede sobrevivir meses en agua.
* <i>Shigella spp.</i>	Bacteria responsable capaz de causar disentería bacilar (diarrea), se produce el contagio por contacto de persona a persona o contaminación del agua y alimentos.

*Estas bacterias pueden ser encontradas a causa de la contaminación del agua utilizada en la producción del cosmético pero solo pueden causar enfermedades entéricas.

11.1.1.2.1 Coliformes totales:

Los coliformes totales se definen como: Bacilos cortos, Gram negativos, aerobios facultativos, no esporulados, con capacidad de fermentar la lactosa a 35 °C en menos de 48 h con producción de ácido y gas. Dentro de los coliformes se encuentran los géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* (Camacho , Giles , Palao , Serrano , & Velázquez, 2009). En la Tabla No. 18 se muestran ejemplos de coliformes totales encontrados en cosméticos:

Tabla 18. Ejemplos de Coliformes Totales encontrados en cosméticos

Especie Bacteriana	Descripción General
<i>Escherichia coli</i>	Es considerado el indicador principal de contaminación por materia fecal, pudiéndose encontrar en el agua utilizada durante la producción del producto o por la manipulación del personal que tenga contacto directo a lo largo del proceso de producción. Las enfermedades que puede causar al tener contacto con la piel son: Conjuntivitis bacteriana e Impétigo, es una infección bacteriana local al nivel de epidermis. (Saavedra Lozano , Santos Sebastián , Hernández Sampelayo , González , & Navarro Gómez, 2008)
<i>Enterobacter sp.</i>	Patógeno oportunista que se encuentra en la piel humana, las plantas, los suelos, el agua, cloacas, en el tracto gastrointestinal y en algunos productos lácteos. Las principales especies aisladas de cosméticos son: <i>Enterobacter gergoviae</i> y <i>Enterobacter aerogenes</i> . Puede producir diversas enfermedades como: Gastroenteritis aguda, infección de las vías urinarias, infecciones en piel. (Navarra, 2004)
<i>Klebsiella sp.</i>	Bacteria presente en forma natural en el tracto gastrointestinal y en ambientes acuáticos. Es un indicador de contaminación fecal en menor proporción a <i>Escherichia coli</i> . Aproximadamente del 60 – 80% de los microorganismos del genero <i>Klebsiella</i> aislados pertenecen a la especie <i>pneumoniae</i> . <i>Klebsiella pneumoniae</i> es un patógeno oportunista causante de infecciones nosocomiales como rinitis y neumonía. Las enfermedades que pueden causar al tener contacto con la piel como: Conjuntivitis bacteriana, infecciones graves en la piel. (Navarra, 2004)
<i>Citrobacter sp.</i>	Patógeno oportunista encontrado con mucha frecuencia en agua, suelo, la comida, tracto gastrointestinal de animales y humanos, cuyo principal especie aislada es <i>Citrobacter freundii</i> . Las enfermedades que pueden causar son: Abscesos, Bacteremia, Meningitis, infecciones en piel y en tejido celular subcutáneo. (Mangenello , y otros, 2001)

11.1.1.2.2 Coliformes fecales:

Este grupo de bacterias es un indicador de contaminación fecal (proveniente de animales o humanos), los coliformes fecales comparten las mismas características que con los coliformes totales, su diferencia radica en la fermentación de la lactosa con producción de ácido y gas en tiempo de 24 a 48 h a una temperatura de 44.5 °C ±0.1°C. (Departamento de Fisicoquímica UNAM, 2012)

Los coliformes fecales están constituidos por:

- *Escherichia coli*—>Representa el 90% del total de indicadores de contaminación de materia fecal.
- *Klebsiella spp.*
- *Citrobacter freundii*
(Burchard Señoret, 2008)

Otras bacterias indicadoras de contaminación fecal:

Además de los coliformes fecales, se pueden encontrar otros microorganismos indicadores de contaminación fecal, que junto con *Klebsiella spp* y *Citrobacter spp* forman el otro 10% del total de indicadores de contaminación fecal. Los cuales se mencionan a continuación:

- *Enterococcus sp*: Los *Enterococcus* son cocos Gram positivos agrupados en pares o en cadenas cortas. Saprófitos que se encuentran en gran proporción en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, además de encontrarse en el tracto genitourinario femenino, por estar razón son considerados indicadores de contaminación fecal, las principales especies aisladas son: *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. (Departamento de Físicoquímica UNAM, 2012) (Acosta, 2005)
- *Clostridium perfringens*: Bacilos Gram positivos anaerobios estrictos considerados buenos indicadores de contaminación por materia fecal ya que se encuentra en el tracto intestinal de animales y en aguas negras. (Departamento de Físicoquímica UNAM, 2012)

11.1.1.3 Bacilos no fermentativos Gram negativos

11.1.1.3.1 *Pseudomonas sp*.

Las *Pseudomonas* son un grupo grande de bacterias patógenas oportunistas, Bacilos Gram negativos aerobios con versatilidad metabólica muy grande, gracias a esto puede desarrollarse fácilmente en cualquier tipo de ambiente y altamente resiste a antibióticos. Esta bacteria se encuentra distribuida ampliamente en el ambiente como en el agua, suelo, vegetación, objetos inanimados, artículos de limpieza, en humanos y animales.

Las principales especies aisladas a partir de cosméticos son:

- *Pseudomonas aeruginosa*: Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza como: En el suelo, el agua, ambientes con alto grado de humedad, por su alta resistencia, su alta capacidad de adaptación y su versatilidad metabólica, pueden encontrarse en los cosméticos que no proporcionan un ambiente óptimo de crecimiento para bacterias con características metabólicas estrictas; como en las máscaras para pestañas y polvos.
Pudiendo causar diversas enfermedades como:
 - Ectima: Es una infección local en la piel, produciendo primeramente lesiones características, que son vesículas con base eritematosa, estas penetran la dermis para posteriormente convertirse en úlceras. (Saavedra Lozano , Santos Sebastián , Hernández Sampelayo , González , & Navarro Gómez, 2008).
 - Infección ocular: Pueden abarcar desde dolor, enrojecimiento, hinchazón, hasta problemas de visión. (Mesa, 2014)
 - Neumonía.
 - Sepsis.
 - Meningitis.
- *Pseudomonas putida*: Esta bacteria se encuentra distribuida principalmente en el suelo y zonas acuosas, pudiendo causar infecciones en la piel, septicemia, neumonía, infecciones en vías urinarias. Es aislada en menor proporción que *Pseudomonas aeruginosa*. (Lemmel, 2008)

11.1.1.3.2 *Burkholderia cepacia*.

Es un bacilo Gram negativo, aerobia, nutricionalmente versátiles, utilizando una variedad de carbohidratos, alcoholes y aminoácidos como fuentes de energía. Se desarrolla con más frecuencia en personas inmunocomprometidas. Tienen una distribución amplia en el medio ambiente,

encontrándose principalmente en el suelo, agua y plantas. Presenta alta resistencia a los antisépticos. Esta bacteria puede desarrollarse en cualquier tipo de cosméticos, ya que pueden ser resistentes a la mayoría de los conservadores empleados. También puede desarrollarse en cosméticos en cuya formulación no tengan nutrientes para el desarrollo de microorganismos más exigentes.

Enfermedades causadas por *Burkholderia cepacia*:

- Infecciones respiratorias graves.
- Infecciones en piel.
- Bacteremia: Al producir una infección en piel, puede atravesar la barrera epitelial e invade el tejido subyacente hasta llegar al torrente sanguíneo produciendo bacteremia.

(Gómez Toscano , Hernández Orozco , González Sardaña , Casteñeda Narváez, & Rosas Ruíz, 2013)

11.1.1.4 Bacilos esporulados:

11.1.1.4.1 Bacilos esporulados aerobios: *Bacillus sp.*

Bacillus sp., son bacilos Gram positivos, rectos, delgados, aerobios o anaerobios facultativos, formadores de endosporas, cuya temperatura óptima de crecimiento oscila entre 28 °C - 40°C. Estas bacterias se encuentran en el suelo o el agua, y las endosporas a su vez se encuentran en el aire. Gracias a su capacidad de resistencia al producir endosporas, *Bacillus sp* se puede encontrar en cualquier tipo de cosmético, donde la principal fuente de contaminación son las materias primas. Los cambios que se pueden presentar en un producto contaminado con *Bacillus sp*, son la fermentación simple, la producción de gas y cambio a un pH ácido. La fermentación simple lo generan las especies *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus coagulans*, esto se da en productos con un pH mayor a 5. *Bacillus coagulans* también es responsable de la acidificación del producto, este género puede desarrollarse en productos cuyo pH sea menor de 4.2.

Bacillus cereus y *Bacillus mesentericus*, son responsables de producción de gas, que altera la funcionalidad del producto y deformación del envase del mismo. *Bacillus macerans* y *Bacillus polymixa* producen la formación de gas y acidifican el medio en el que están presentes.

(Facultad de Química UNAM, 2007)

Enfermedades causadas por *Bacillus sp*:

- Diarreas severas.
- Enemas.
- Bacteremia.
- Queratinitis.
- Oftalmitis.
- Panafalmitis.

(Paster , Falkler , Enwonwu, Idigbe , Savage , & Levanos , 2002)

11.1.1.4.2 Bacilos esporulados anaerobios: *Clostridium sp.*

Clostridium sp., son bacilos Gram positivos, anaerobios estrictos, formadoras de endosporas, altamente sacarolíticos, encontrándose principalmente en el suelo y el tracto gastrointestinal de humanos y animales siendo indicador de contaminación por materia fecal.

Estos microorganismos son capaces de producir ácido y gas a partir de la metabolización de diversos carbohidratos en cualquier medio en que se encuentren. Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 20°C - 50°C.

Esta bacteria que es anaerobia estricta puede desarrollarse en productos con pH mayor a 4.5, pueden encontrarse en asociación con microorganismos aerobios, estos consumen todo el oxígeno contenido

en el medio dando las condiciones adecuadas para el crecimiento de *Clostridium sp.* (Facultad de Química UNAM, 2007)

Las especies del género *Clostridium*, que pueden ser aislados son los siguientes:

- *Clostridium botulinum.*
- *Clostridium hystolyticum.*
- *Clostridium sporogenes.*
- *Clostridium bifermentans.*
- *Clostridium butyricum.*
- *Clostridium pasteurianum.*
- *Clostridium perfringens.*

Enfermedades causadas por *Clostridium sp*:

- Infecciones en piel y tejidos blandos.
- Bacteremia.
- Infecciones intrabdominales.
- Infecciones biliares.
- Infecciones del tracto gastrointestinal.
- Celulitis crepitante.
- Gangrena gaseosa.

(Miranda & Rojo , 2015)

11.1.2 Levaduras y Hongos filamentosos más frecuentes encontrados en cosméticos

11.1.2.1 Levaduras más frecuentes en cosméticos

11.1.2.1.1 *Candida albicans*

Esta levadura tiene un papel muy importante en el área clínica y en el sector industrial. Esto es debido a la gran distribución mundial que tiene. Puede encontrarse fácilmente en el suelo o el agua. Es una levadura saprófita en seres vivos de sangre caliente, encontrándose en distintas zonas del organismo como: La piel, cavidad oral, tracto gastrointestinal y sistema genitourinario. Tiene una temperatura óptima de crecimiento de 37°C, considerado un patógeno oportunista. Pese a que existen otras especies patógenas del género *Candida* la especie *albicans* es la más importante dado que esta es aislada en un 70% del total de las infecciones en general causadas por *Candida*. (Carrillo , Brió, & Cárdenas , 2002)

Originalmente se presenta como saprófita en individuos sanos ya que flora bacteriana y el sistema inmune limita su crecimiento e inhibe su excesiva proliferación.

Cuando el hospedero presenta deficiencias en el sistema inmune como por ejemplo pacientes con SIDA, pacientes con cáncer, pacientes sometidos a tratamientos con esteroides o inmunosupresores o cuando el hospedero presente una disminución de la microbiota por tratamiento de fármacos *Candida albicans* puede proliferar sin algún control. (Castrillón Rivera , Palma Ramos , & Padilla Desgarenes, 2005)

Candida albicans no puede sobrevivir mucho tiempo en superficies secas, es necesaria la presencia de humedad. En el sector industrial puede aislarse en productos con humedad elevada como cepillos dentales, cosméticos, ropa y alimentos. En cosméticos puede encontrarse en productos con recipiente donde conserve la humedad y el producto tenga un pH ácido de 4-5. (Martin , 2012)

Una de las características que hace que *Candida albicans* sea de los microorganismos más importantes es su capacidad dimórfica; es decir la capacidad de cambiar de forma anatómica, ya

sea forma de hongo filamentoso o con forma de hongo levaduriforme. Este proceso es irreversible en función de la temperatura, la concentración de nutrientes presentes en el medio y el pH. Presenta forma filamentosa a una temperatura de 25 ° C en la naturaleza; por el ejemplo en el suelo. Este presenta forma levaduriforme a una temperatura de 37 ° C, a un pH ácido y en una alta concentración de nutrientes. Al encontrarse como saprófito cuando las defensas se ven comprometidas, esta levadura produce infecciones superficiales en la piel, en las mucosas y en las uñas (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene de España, 2012). La conversión de levadura a hongo filamentoso (forma infectante) en el cuerpo humano se tiene que dar a una temperatura de 37°C a un pH neutro, dando la capacidad de invadir los tejidos, al formar los filamentos es capaz de evadir los mecanismos de defensa del huésped.(Arastegui , 2002)

Enfermedades causadas por *Candida albicans*:

- Infecciones orales.
- Infecciones cutáneas.
- Infecciones esofágicas.
- Infecciones urinarias e intestinales.
- Onicomycosis.
- En casos severos produce la necrosis de tejidos.
(Martin , 2012)

11.1.2.2 Hongos filamentosos más frecuentes en cosméticos.

11.1.2.2.1 *Aspergillus sp.*

Existen una gran variedad de especies del genero *Aspergillus* encontrándose un total de 180 alrededor del mundo, pero dentro de las especies comúnmente encontradas en el área clínica e industrias se encuentran: *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus*. (Salas Tellez, Nuñez del arco, Flores Vallejo , & Amaya Leon , 2011)

Aspergillus spp es un hongo filamentoso que se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente, encontrándose principalmente en el agua, aire, suelo, alimentos y plantas. También pueden ser encontrados en cosméticos por contaminación de la materia prima, del personal o de los componentes en los que son envasados para su venta, en productos donde el envase conserve gran cantidad de humedad, no sea traslucido y el producto tenga un pH de 2.5 a 7.5, tolerando mejor un medio ácido que un medio alcalino. Su temperatura óptima de crecimiento en el medio ambiente oscila en los 25 °C (Gimeno, 2002)

Este hongo es considerado un patógeno oportunista, suele afectar al individuo cuando este presenta deficiencias en sus mecanismos de defensa. Este hongo puede causar enfermedad mediante tres vías principales:

- Hipersensibilidad (alergia).
- Invasión (micosis).
- Intoxicación por ingesta de metabolitos fúngicos.
(Méndez Tovar , 2015)

Los primeros dos mecanismos son los que se pueden originar en caso de contaminación en los cosméticos por *Asperigillus spp*, pudiendo causar enfermedad alérgica, infección local en piel o producir cuadros invasivos severos. Adquiriéndose mediante penetración del hongo por vía respiratoria, inoculación cutánea o por contacto directo de las esporas, que son la forma infectante de este hongo. Entre los factores de patogenicidad de este hongo destacan: El tamaño pequeño de sus conidias que pueden ser aspiradas, y debido a su tamaño pueden llegar hasta el pulmón y senos

paranasales para posteriormente producir infección. Es capaz de crecer a 37°C (temperatura corporal normal), también cuenta con capacidad de adherencia a superficies epiteliales y endoteliales, tienden a invadir vasos sanguíneos. (Salas Tellez, Nuñez del arco, Flores Vallejo , & Amaya Leon , 2011).

11.1.2.2.2 *Penicillium sp.*

Hongo filamentoso ampliamente distribuido en la naturaleza, se pueden encontrar en el suelo, la vegetación y el aire. Son contaminantes habituales en el laboratorio, áreas de producción, en la materia prima y en los componentes que contienen los productos cosméticos. En los productos terminados presentan mayor contaminación los productos con envase que pueda conservar la humedad y que no permitan el paso de luz. Este hongo tiende a crecer en productos cuyo pH oscile de 2.5 y 7.5. Su temperatura óptima de crecimiento abarca los 25 °C. (Argentina, 2014)

Este hongo puede causar infecciones en personal que presentes deficiencias en el sistema inmune, considerado un hongo oportunista pudiendo crecer a temperatura corporal.

Enfermedades causadas por *Penicillium spp*:

- Infecciones cutáneas.
- Alergias respiratorias.
- Otomicosis.
- Endoftalmitis.
- Queratitis.
- Esofagitis.
- Neumonías necrotizantes.

(Carrillo, 2013)

11.1.2.2.3 *Cladosporium sp.*

Es un hongo saprófito, que tiene una gran distribución en la naturaleza, encontrándose en el suelo, en la vegetación y fómites. En el sector industrial se puede encontrar en la madera húmeda, alimentos, cosméticos (principalmente cremas y en productos donde el envase no traspase la luz), plásticos, papel y ropa. Tiene una temperatura óptima de crecimiento va de 18 °C a 25°C, no puede crecer a temperaturas elevadas 35 °C, requieren un alto contenido de humedad y el pH debe de oscilar de 2.5 a 7.5.

Enfermedades causadas por *Cladosporium sp*:

- Alergias por inhalación de esporas.
 - Infección en piel (No se disemina, solo se limita en la zona de la lesión).
 - Inoculación por traumatismo.
- (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo de España, 2014)

CAPÍTULO 12. PRINCIPALES FUENTES DE CONTAMINACIÓN DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN

A lo largo del proceso de producción del producto cosmético es necesario cuidar ciertos aspectos que pueden ser críticos para la contaminación microbiológica del producto, como: El cuidado, manejo y resguardo adecuado de la materia prima, aseo adecuado del personal en el área de producción, control del medio ambiente en el que es fabricado y almacenamiento del producto, etc.

Se pueden dividir en diferentes categorías el grado de susceptibilidad que pueda tener el producto el cual se mencionan en la Tabla No.19:

Tabla 19. Grado de susceptibilidad de crecimiento microbiológico en productos cosméticos. (Garcés, 2009)

Tipo de susceptibilidad	Descripción
Susceptibilidad alta	Los microorganismos que contaminan el producto pueden adaptarse, desarrollarse y reproducirse sin problemas en el mismo.
Susceptibilidad media	Permite la supervivencia por largos periodos del microorganismo, pero este no puede crecer ni reproducirse adecuadamente.
Susceptibilidad baja	Dificultan la adaptación y desarrollo de los microorganismos comunes, pero pueden sobrevivir microorganismos más resistentes (Ejemplo: <i>Pseudomonas spp.</i>)
No susceptibles	No permiten el desarrollo de los microorganismos.

A continuación se desglosan las principales fuentes de contaminación microbiológica que puede sufrir el producto cosmético a lo largo del proceso de producción.

12.1 Materia prima.

La materia prima es una de las principales fuentes de contaminación del producto ya que de la susceptibilidad de contaminación de la materia prima depende del origen que tenga la misma, la presentación que tiene y las condiciones de almacenamiento.

Como se mencionó con anterioridad es necesario cuidar las condiciones de almacenaje de las materias primas para así disminuir el riesgo de contaminación microbiológica o en consecuencia de un almacenaje deficiente, que la materia prima sufra una serie de modificaciones que lo pueda hacer más susceptible a contaminación.

Condiciones de almacenaje a controlar:

- Sanitización previa de los envases que contendrán a las materias primas.
- Control de temperatura del almacén.
- Todos los envases que contengan materias primas deben de estar por encima del suelo.
- Control de la humedad relativa del almacén.

Para poder determinar el grado de susceptibilidad a contaminación microbiológica que puede tener la materia prima, es necesario saber el origen que tiene la misma, esta clasificación de origen de la materia prima se encuentra en la tabla No.20:

Tabla 20. Tipo de origen de la materia prima. (Garcés, 2009)

Origen	Microorganismos que pueden crecer
Natural	Todas las materias primas que sean de origen animal o vegetal, son muy propensas a contaminación microbiológica, para esto es necesario un procedimiento previo de desinfección. Se pueden encontrar todo de tipo de bacterias, hongos y levaduras.
En forma de polvo	Este tipo de materia prima no es el ambiente ideal para la mayoría de los microorganismos, pero si se pueden encontrar bacterias anaerobias como <i>Clostridium spp</i> y bacterias capaces de formar esporas como <i>Bacillus spp</i> .
Sintético	Generalmente si son sometidas a un proceso previo de desinfección no presenta presencia de microorganismos, pero puede verse contaminada por un mal manejo del personal a lo largo del proceso de producción, o malas condiciones de almacenaje.
Graso	Como aceites, grasas y ceras, estas no proporcionan un ambiente adecuado para el desarrollo de microorganismos comunes, pero se puede contaminar con microorganismos con versatilidad metabólica como <i>Pseudomonas spp</i> .
Agua de proceso	El agua utilizada para la producción del producto cosmético, puede estar contaminado con todo tipo de microorganismos: Bacterias, hongos y levaduras.

12.2 Medio Ambiente.

Al controlar el medio ambiente en donde es producido el producto cosmético se reduce significativamente el riesgo a contaminación microbiológica.

La estructura del área de producción es muy importante, ya que esta debe de tener paredes y pisos lisos sin imperfecciones que puedan ser reservorios para microorganismos, estos deben ser impermeables y resistentes al desgaste. El aire que circula dentro del área de producción debe ser controlada lo máximo posible. Las entradas a estas mismas áreas deben de estar controladas.

Cuando el ambiente dentro del área de producción no se encuentra controlado, este mismo puede contener una gran cantidad de microorganismos como:

- Microorganismos formadoras de esporas: *Clostridium spp* y *Bacillus spp*.
- Microorganismos no esporulados como: *Staphylococcus sp* y *Streptococcus sp*.
- Hongos como: *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* y *Mucor sp*.

(Garcés, 2009)

Estos microorganismos se pueden encontrar suspendidos en partículas de polvo, gotas de humedad, etc.

El control del número de microorganismos en el ambiente depende de la limpieza del área, el contenido de humedad presente y las actividades que se llevan a cabo en ella.

12.3 Contaminación del producto a causa del personal.

Otra de las principales fuentes de contaminación en los productos, es el personal que tiene contacto directo en todo el proceso de producción que va desde: La recepción, transporte, almacenamiento, proceso y el acondicionamiento del mismo. En todas estas etapas todo el personal debe de realizar ciertas medidas preventivas para evitar contaminación por microorganismos en el producto. Todo personal de operación debe de tener en primer lugar una capacitación para que estos comprendan que son origen potencial de contaminación así como todas las medidas preventivas que deben realizar.

Los microorganismos pueden ser transferidos del personal de operación al producto, son aquellos que se encuentran principalmente como flora normal en la piel. *Staphylococcus aureus*, es la principal bacteria contaminante ya que esta se encuentra en diferentes zonas de la piel como las manos, la cara, el cuello. Otro microorganismo que se encuentra en la flora normal de la piel y puede ser transferido es *Candida albicans*.

Pueden transferirse microorganismos patógenos a través de la saliva, esputo y moco como: *Streptococcus sp*, *Klebsiella pneumoniae* etc. Otro tipo de microorganismos que pueden contaminar el producto a causa del personal, son microorganismos presentes en heridas como *Pseudomonas spp*, o microorganismos indicadores de contaminación por materia fecal como *Escherichia coli*. Es necesario tomar medidas preventivas para evitar la contaminación del producto durante el proceso, estas medidas se describen en la figura No. 13: (Garcés, 2009)



Figura 13. Medidas preventivas para el personal de operación. (s.a Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control, 2015)

12.3.1 Cuidado de la salud del personal.

Desde la contratación del personal de operación se deben de realizar periódicamente exámenes médicos para evaluar el estado de salud del mismo, además de que los jefes directos estén observando al personal en caso de que estos presenten enfermedad o accidentes que produzcan heridas. Y en caso de existir enfermedad o herida, el médico laboral debe de evaluar si la enfermedad se encuentra en estado de transmisión. O en caso de herida evaluar si es posible que se encuentre en el área de producción, esto para evitar continuación hacia el producto y cuidar la seguridad del operador.

12.3.2 Manipulación adecuada del producto.

Todo manejo del producto cosmético durante el proceso de producción debe de realizarse bajo condiciones adecuadas de higiene, el personal operador debe de contar con equipo que disminuya el riesgo de contaminación, así como el lavado periódicamente de las manos, prohibir cualquier consumo de alimentos, bebidas y el fumar dentro y cerca del área de producción.

También se debe de evitar el uso de aretes, maquillaje para el caso de las mujeres, anillos, relojes o cualquier objeto que forme parte el equipo de protección personal.

12.3.3 Higiene del personal.

Todo personal de operación debe de cumplir con ciertas medidas de higiene para evitar en gran parte la contaminación del producto, para ello es necesario que este personal este capacitado con el conocimiento y procedimiento adecuado para llevar a cabo estas prácticas, las cuales son:

- Ducha diaria.
- El personal masculino debe de presentarse siempre afeitado.
- Uñas cortas.
- Lavado adecuado de manos.
- Cabello corto o recogido.
- Utilizar el equipo de protección (Este deberá estar limpio).

12.3.4 Equipo de protección personal.

El uso de equipo de protección personal tiene funciones muy importantes porque este protege al personal de accidentes laborales y también protegen al producto de contaminación, este equipo debe de utilizarse solamente en las áreas de producción o en las que se tenga contacto directo con el producto, la utilización de diferentes tipos de equipo varía dependiendo del lugar de la cadena de producción que se encuentre el operador.

Equipo de protección personal utilizado.

- Guantes de látex o nitrilo.
- Cofia.
- Bata.
- Calzado de seguridad
- Cubrecocas.
- Casco de seguridad.
- Traje de protección.
- Lentes de seguridad.

12.4 Equipos y componentes destinados al producto final.

Las superficies inertes como los equipos (fabricación, envasado o de análisis) y los componentes en los que son acondicionados el producto como son los envases, empaques, tubos, tapas, aspersores etc., son fomites importantes que se tienen que cuidar para evitar la contaminación de los productos para el productos.

Si los equipos no son sanitizados adecuadamente durante periodos adecuados es muy probable la presencia de microorganismos contaminantes, estos pueden variar dependiendo del tipo de nutrientes disponibles, del pH y la temperatura.

Con respecto a los componentes para los productos cosméticos el tipo de microorganismos contaminantes dependerá de los materiales con el que estén hechos y el tipo de almacenamiento. En caso de cualquier envase o componente de vidrio se pueden encontrar bacterias esporuladas como *Bacillus spp*, u hongos formadores de esporas como *Aspergillus spp* y *Penicillium spp*. Para los componentes de cartón o plástico cuyas condiciones de almacenaje no son las adecuadas pueden contener un alto grado de humedad lo cual puede incrementar considerablemente el número de microorganismos contaminantes. (Garcés, 2009).

CAPÍTULO 13. MANEJO ADECUADO DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

El manejo adecuado de la muestra para análisis microbiológico depende de la naturaleza del producto cosmético y del punto en el que este se encuentre en el proceso. En la figura No.14 se desglosan las condiciones adecuadas para el muestreo de acuerdo al tipo de muestra. Para todo tipo de muestreo se debe de contar con cofia, guantes, cubrebocas y algún agente químico como cloruro de benzalconio, que se utiliza para la desinfección de las manos (guantes) al momento del muestreo.

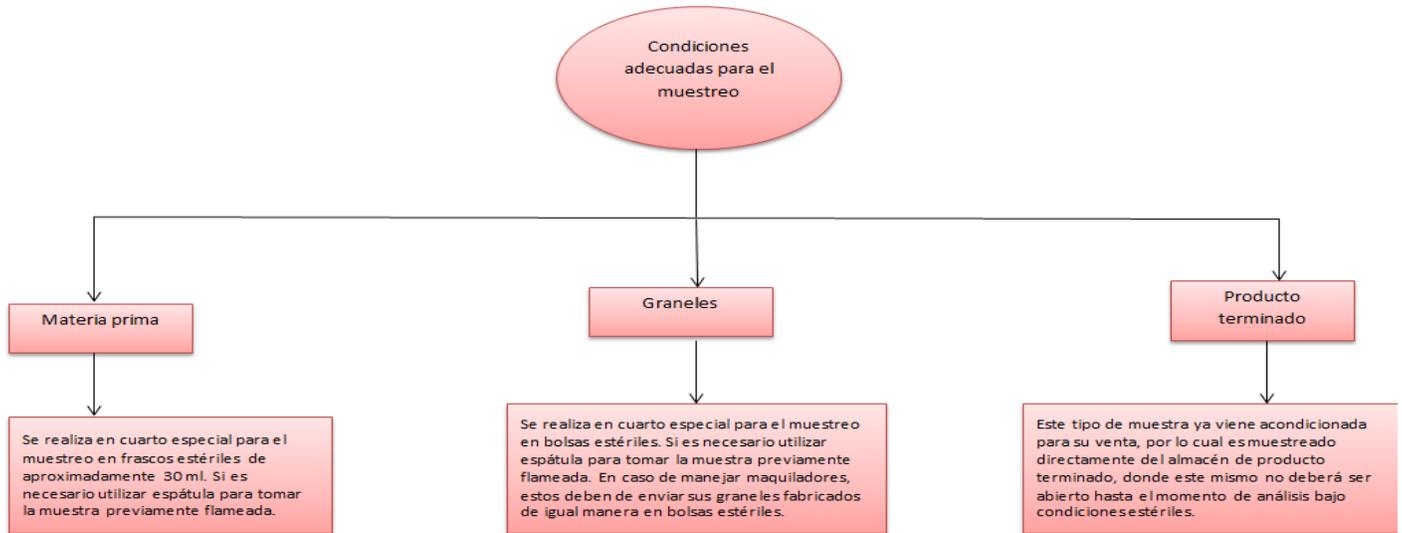
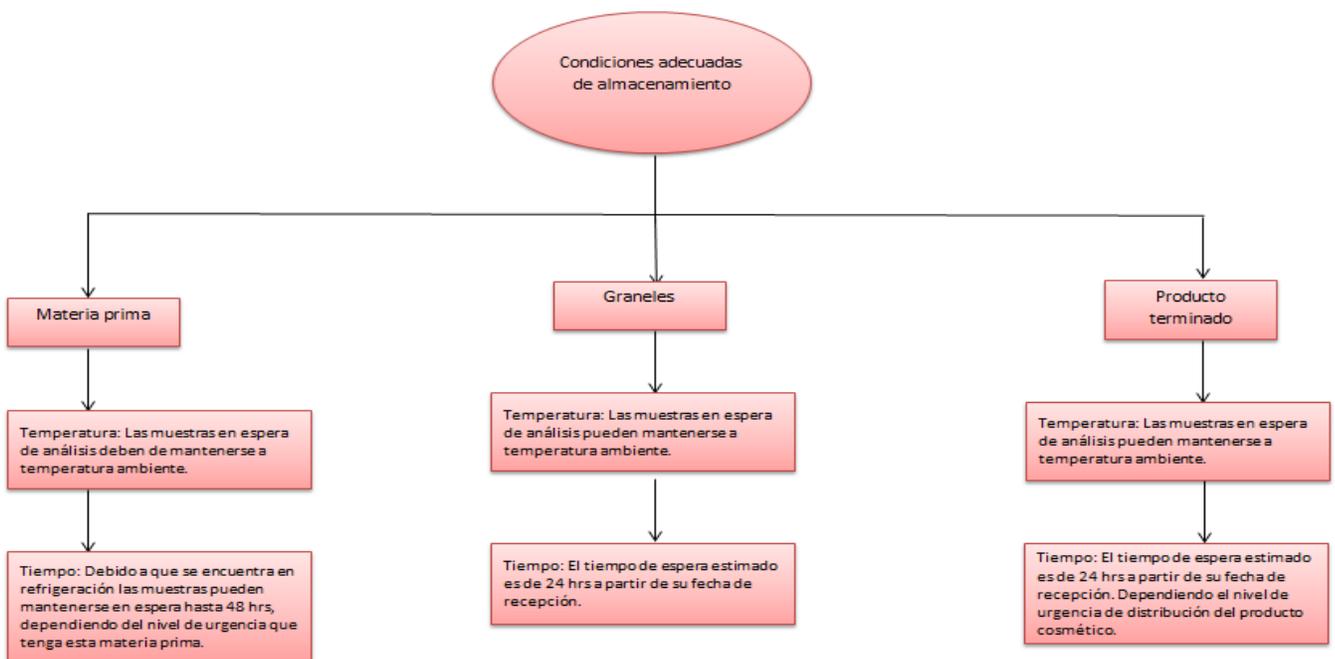


Figura 14. Condiciones adecuadas para el muestreo de muestras cosméticas de acuerdo en el punto del proceso en el que se encuentra. (Espinosa, 2001)

Estas muestras de igual forma deben de ser sometidas a ciertas condiciones de almacenamiento, en espera de que sea realizado el análisis microbiológico, para que los resultados de estos análisis sean representativos y confiables. A continuación en la figura No. 15 se muestran las condiciones óptimas de almacenamiento de acuerdo al tipo de muestra en el que se realizara el análisis microbiológico.

Figura 15. Condiciones adecuadas para el almacenaje de espera para análisis microbiológico de muestras



cosméticas de acuerdo en el punto del proceso en el que se encuentre. (Espinosa, 2001)

CAPÍTULO 14. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUA DE PROCESO.

Cuando un producto cosmético presenta contaminación microbiológica, es necesario determinar el punto en el proceso donde este pudo ser expuesto a una fuente de contaminación.

Para ello y como forma preventiva, al igual que la materia prima, el agua de proceso con la cual son fabricados los productos cosméticos tiene que ser sometidos a análisis microbiológico, para evitar que el agua utilizada tanto en la formulación del cosmético, como la utilizada en la limpieza de los equipos y la maquinaria, se encuentre contaminada con microorganismos patógenos.

Existen diversos métodos de análisis para determinar si el agua que se ha utilizado en el proceso se encuentra contaminada, entre los métodos más comunes se encuentran:

- Método de cuenta de microorganismos en placa.
- Determinación de bacterias coliformes. Técnica de número más probable (NMP)
- Determinación de bacterias coliformes: Técnicas enzimáticas (Readycult®)
- Crecimiento en caldo nutritivo. (para *Pseudomonas spp.*)

14.1 Técnica de Muestreo para el agua de proceso.

Al realizar el muestreo del agua de proceso en primer lugar se necesita precisar: La cantidad, el tamaño y el volumen de la muestra, además de los intervalos para la toma de la misma.

Esto dependerá de ciertos aspectos como: Para qué fin del proceso será utilizada esta agua, el tamaño del lote que se esté produciendo, si el agua utilizada es distribuida por sistemas de abastecimiento público, etc. Todos estos aspectos deben de ser tomados en cuenta para los resultados reportados sean considerados representativos y confiables. (Departamento de Ciencias Biológicas, 2009) (NOM-179-SSA1-1998,2001). El muestro debe de realizarse bajo condiciones adecuadas de asepsia, con el fin de evitar contaminación externa (ambiental y humana) y dar resultados como poco confiables.

Condiciones para la toma de muestra:

- Utilizar el equipo de protección personal: Bata, cofia, cubrebocas y guantes.
- Si la limpieza del grifo o válvula seleccionada es dudosa elegir otro grifo o válvula. Si se requiere tomar la muestra en el grifo o válvulas de dudosa limpieza por propósitos especiales del muestreo, debe limpiarse el orificio de salida con una gasa estéril o torunda de algodón impregnada de solución de hipoclorito de sodio con una concentración de 100 mg/l
- Limpiar con la misma solución sanitizante, grifos o salidas de agua en donde se tomará la muestra, dejando secar previamente la solución.
- Frascos de vidrio con tapón esmerilado, frascos estériles desechables o bolsas estériles con cierre hermético y capacidad de 125 o 250 ml. Para la técnica de NMP, la toma de muestra se efectuara en bolsa estéril que contenga una pastilla de Tiosulfato de sodio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. (NOM-230-SSA1-2002, 2005)

14.2 Método de cuenta de microorganismos en placa.

Esta técnica es utilizada para determinar la presencia de microorganismos viables, presentes en la muestra de agua especialmente la presencia de mesófilos aerobios, estos incluyen bacterias hongos y levaduras. El número de colonias contadas es un estimado de la cantidad presente de microorganismos. La técnica esta descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. En la figura No.16 se describe de forma sencilla este método.

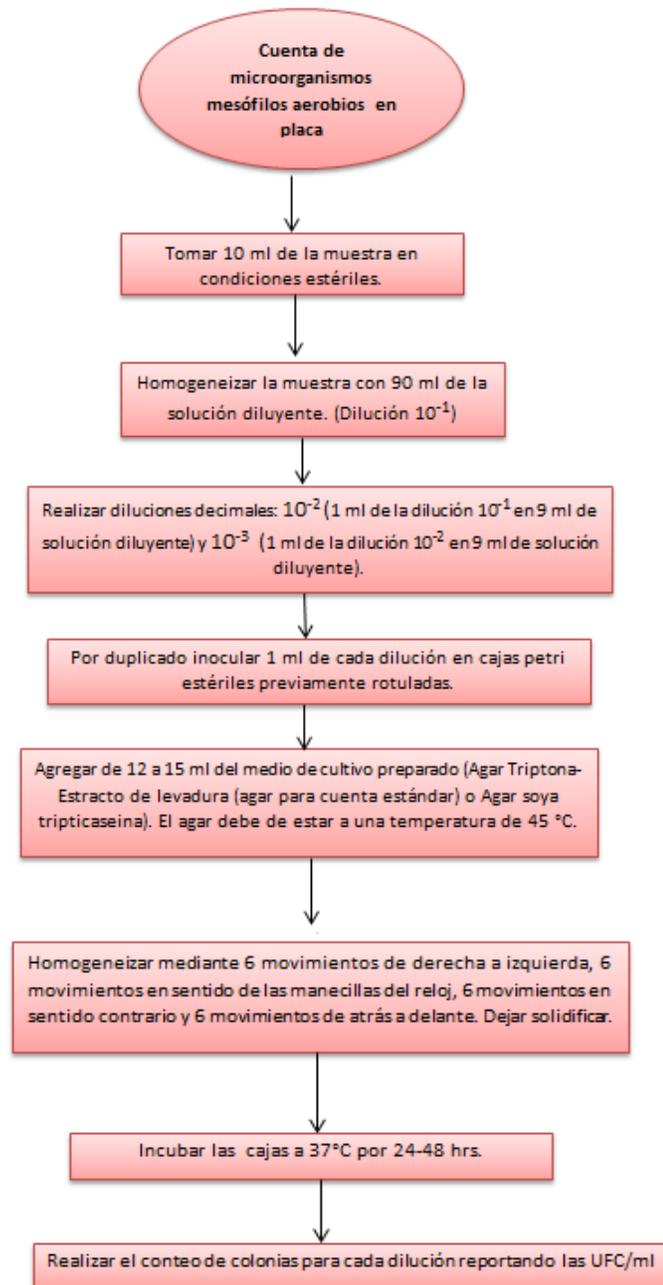


Figura 16. Metodología para la cuenta de microorganismos mesófilos aerobios en placa (NOM-092-SSA1-1994,1995) (Departamento de Ciencias Biológicas, 2009) (Camacho , Giles , Ortegón , Palao , Serrano , & Velázquez , 2009)

14.3 Crecimiento en caldo nutritivo.

Este método es utilizado para determinar la presencia de *Pseudomonas spp*, el cual se desglosa a continuación en la figura No. 17. Al detectar la presencia de *Pseudomonas spp* podemos determinar que en las tuberías en las que se distribuye el agua se encuentra la presencia de biocapa o bioflim donde es necesario tomar medidas para erradicarlo.

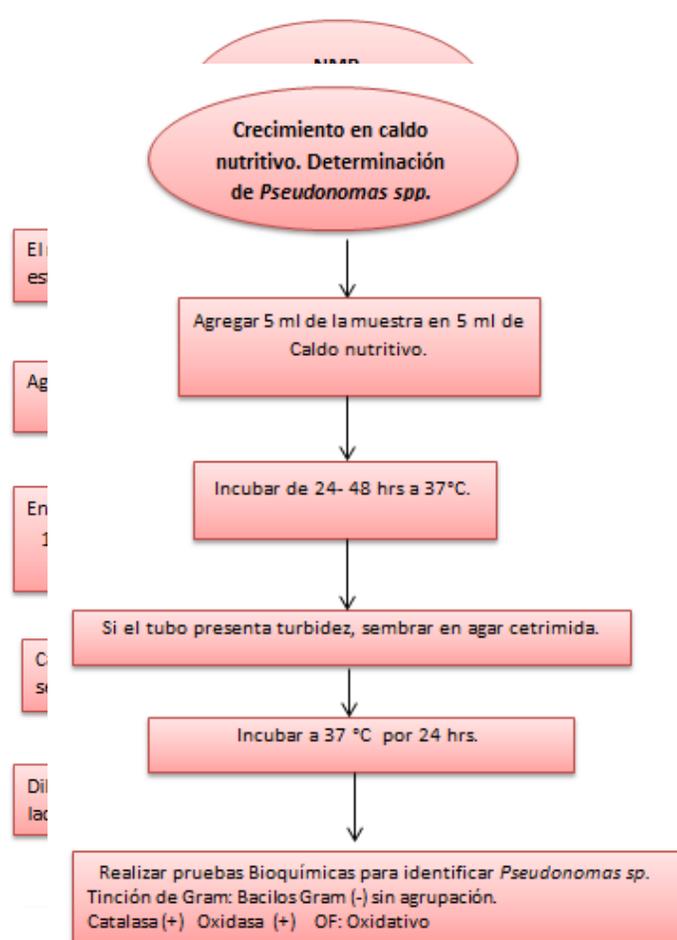


Figura 17: Metodología para la técnica de crecimiento en caldo nutritivo para *Pseudomonas spp.* (Torrice Helguero, 2012) (Departamento de Ciencias Biológicas, 2009)

14.4 Determinación de bacterias coliformes. Técnica de número más probable (NMP)

De acuerdo a la secretaria de salud es prioridad la detección de coliformes totales y fecales para la prevención de enfermedades gastrointestinales, estos microorganismos no deben ser detectables en muestras de 100 ml. (NOM-179-SSA1-1998,2001). La técnica de número más probable (NMP) es una de las técnicas más utilizadas en la detección de coliformes totales y fecales en agua para uso y consumo humano. Esta técnica se fundamenta en las características metabólicas de los coliformes, este grupo microbiano son bacilos aerobios facultativos, que producen ácido y gas al fermentar la lactosa a una temperatura de 37 °C de 24 a 48 horas, para la fase confirmativa de número más probable se utiliza un medio de cultivo que contenga sales biliares, que es un medio en donde los coliformes pueden crecer ya que se encuentran de manera habitual en el tracto gastrointestinal del humano y animales (Universidad Autónoma Metropolitana, 2015). Esta técnica está dividida en dos fases: La fase presuntiva y la fase confirmativa, las cuales se desarrollan a continuación:

14.4.1 Fase presuntiva (posible presencia de coliformes totales)

En esta fase los resultados positivos no indican la presencia de los grupos bacterianos de interés (coliformes totales y fecales), la presencia de estos grupos bacterianos puede confirmarse en la segunda fase de NMP. Esta fase de la técnica esta descrita en la figura No.18:

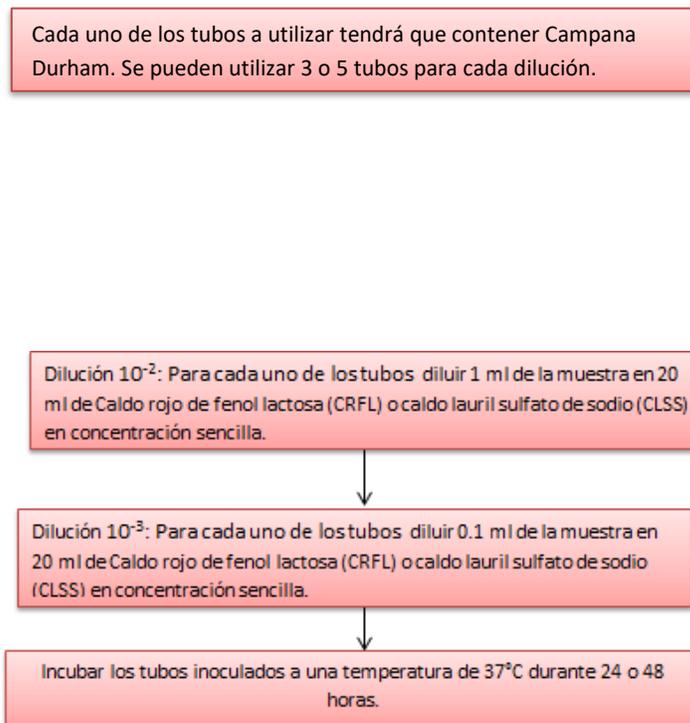


Figura 18.

Metodología para la fase presuntiva de la técnica Número más probable.

(Departamento de Ciencias Biológicas, 2009) (Universidad Autónoma Metropolitana, 2015)

(NOM-112-SSA1-1994, 1994)

*Es indispensable someter la muestra de agua al Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), ya que este tiene la función de neutralizar la acción del cloro que pudiera contener la muestra, el cual al no ser neutralizado podría interferir en los resultados de los análisis.

Interpretación:

- Se tomara como positivo a los tubos que presenten turbidez, producción de ácido que se puede observar por cambio de color en el medio, debido al indicador de pH y producción de gas visible en la Campana Durham. (Universidad Autónoma Metropolitana, 2015). En la Figura No.19 se muestra un ejemplo del tubo con resultado positivo.

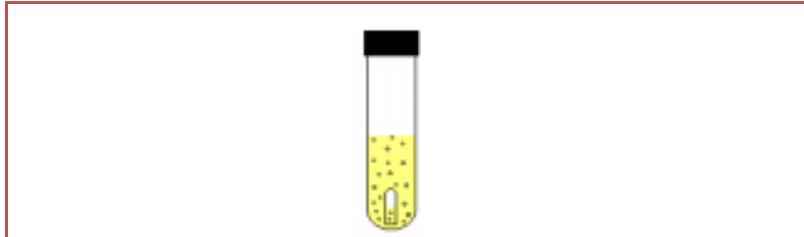


Figura 19. Ejemplo de tubo positivo de la prueba presuntiva (Camacho, Giles, Palao, Serrano, & Velázquez , 2009)

- Si al transcurrir las 48 h de incubación los tubos no presentan ningún cambio, se tomaran como negativos, como se muestra en la figura No.20. Al dar este resultado se dará por terminado el análisis reportando como ausente los coliformes totales y coliformes fecales (Universidad Autónoma Metropolitana, 2015).

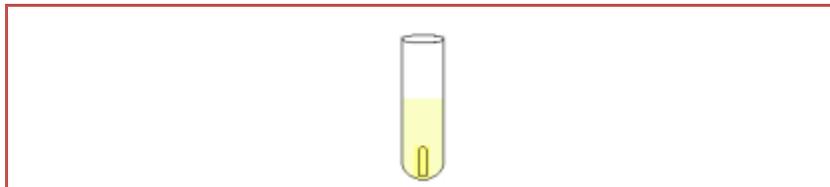


Figura 20. Ejemplo de tubo negativo de la prueba presuntiva (Camacho, Giles, Palao, Serrano, & Velázquez , 2009)

Al finalizar el tiempo de incubación de la prueba presuntiva y teniendo el número de tubos positivos por dilución se determina el Número más probable con ayuda de tablas establecidas en la Norma Mexicana-AA-42-1987, el NMP se determinará dependiendo del número de tubos utilizados por dilución (3 ó 5). Estas tablas se presentan en el Anexo A. (NMX-AA-42-1987,1987).

14.4.2 Fase confirmativa (para coliformes totales y coliformes fecales)

Esta parte de la técnica se realiza para confirmar que los tubos que arrojaron un resultado positivo en la prueba presuntiva, realmente se tratan del grupo de los coliformes, ya que en la fase confirmativa es utilizado un medio de cultivo que contiene sales biliares, dando al grupo de los coliformes un ambiente propenso para su crecimiento.

Esta segunda fase sirve para determinar y confirmar indicios de contaminación fecal en la muestra de agua. A continuación en la figura No.21 se desglosa el procedimiento para esta parte de la prueba. (Universidad Autónoma Metropolitana, 2015)

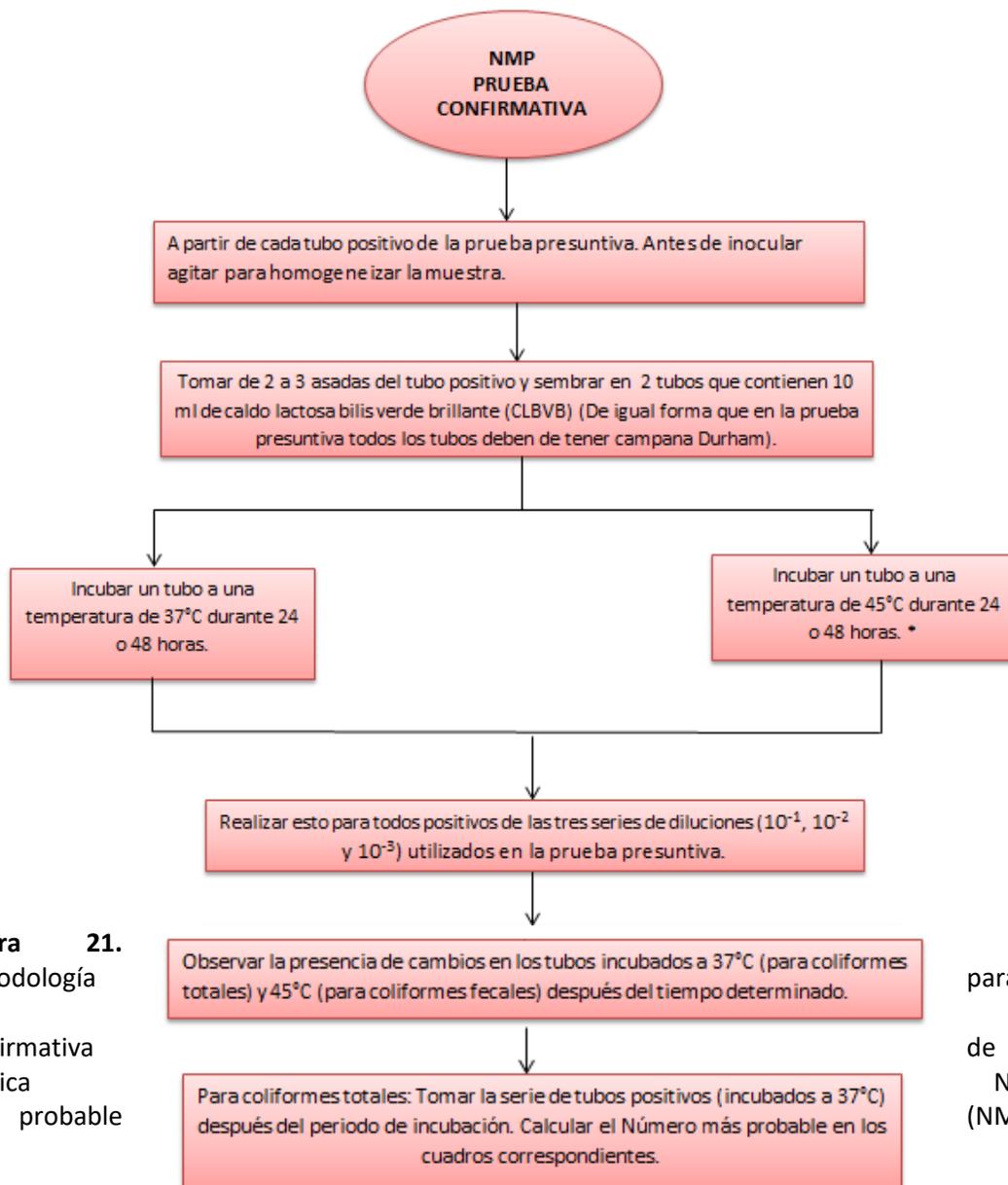


Figura 21.
Metodología
fase
confirmativa
técnica
más probable

para la
de la
Número
(NMP)

(Departamento de Ciencias Biológicas, 2009) (Universidad Autónoma Metropolitana, 2015)

*Para confirmar la presencia de coliformes fecales puede utilizarse CLBVB o caldo *Escherichia coli* (EC)

Ver anexo 1 tablas para el cálculo de número más probable.

Interpretación:

Para coliformes totales

- Los tubos se consideran positivos si se observa turbidez y producción de gas, como se muestra a continuación en la Figura No. 22:



- Si en todos los tubos no se observa cambio el resultado es negativo. Como se muestra en la Figura No.23:



- Si en ninguno de los tubos se observa producción de gas, aun cuando se observa turbidez, el resultado se considera negativo.

Para coliformes fecales:

- Si los tubos incubados a 45°C se observa turbidez y producción de gas la prueba se considera positiva. Ya que los límites permisibles que reporta la NOM-127-SSA1-1994 de coliformes fecales es ausencia, no es necesario establecer el número más probable de estos.
- Al no observar producción de gas, aun cuando exista presencia de turbidez, se reporta ausencia de coliformes fecales. (Universidad Autónoma Metropolitana, 2015)

14.5 Detección de bacterias coliformes: Técnicas enzimáticas (Readycult®)

Existen técnicas que nos permiten detectar la presencia o ausencia de microorganismos coliformes totales y fecales de una manera rápida y confiable. Esto se puede realizar en base a la determinación de la actividad enzimática específica que presentan estas bacterias.

Para realizar esta técnica es necesario contar con capsulas Readycult®, las cuales contienen en su formulación un alto contenido de peptonas y fosfato, creando un ambiente idóneo para el crecimiento rápido de coliformes. Esta formulación también contiene lauril sulfato con el cual se inhiben los microorganismos Gram (+), que pueden estar en asociación con dichos coliformes.

Fundamento:

Se realiza una detección simultánea de coliformes totales y fecales, debido a la utilización de dos sustratos: El sustrato cromogénico, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-GAL) y el sustrato fluorogénico, 4-metilumbeliferil-β-D-glucuronido (MUG). Los coliformes contienen la enzima β-D-galactosidasa que degrada al sustrato X-GAL (sustrato cromogénico), contenido en las capsulas de Readycult® produciendo una coloración azul-verde, si al terminar el tiempo de incubación se observa este cambio de coloración indica la presencia de coliformes totales. (Merk, 2016)

Para la detección de coliformes fecales se utiliza el sustrato fluorogénico MUG, el cual es degradado por la enzima β-D-glucuronidasa que se encuentra en los coliformes fecales, produciendo fluorescencia de color azul, observable bajo luz UV (365nm).

Cuando se finaliza el tiempo de incubación determinado, si se observa la producción de fluorescencia, para determinar la presencia de *Escherichia coli*, que es el principal indicador de contaminación fecal, se realiza la prueba de Indol. Al estar presente al aminoácido triptófano en las capsulas de Readycult® *Escherichia coli* tiene enzimas triptofanasas, que oxidan el triptófano en: Indol, metil indol y ácido indolacético.

Se utiliza el reactivo de Ehrlich (p-formildimetilanilina) o Kovacs (p-dimetilamino benzaldehído) reacciona con el indol presente en el medio formando un compuesto color violeta o rojo. (Departamento de Ciencias Biológicas, 2009). En la Figura No.24 están descritos los pasos a realizar para esta técnica enzimática:

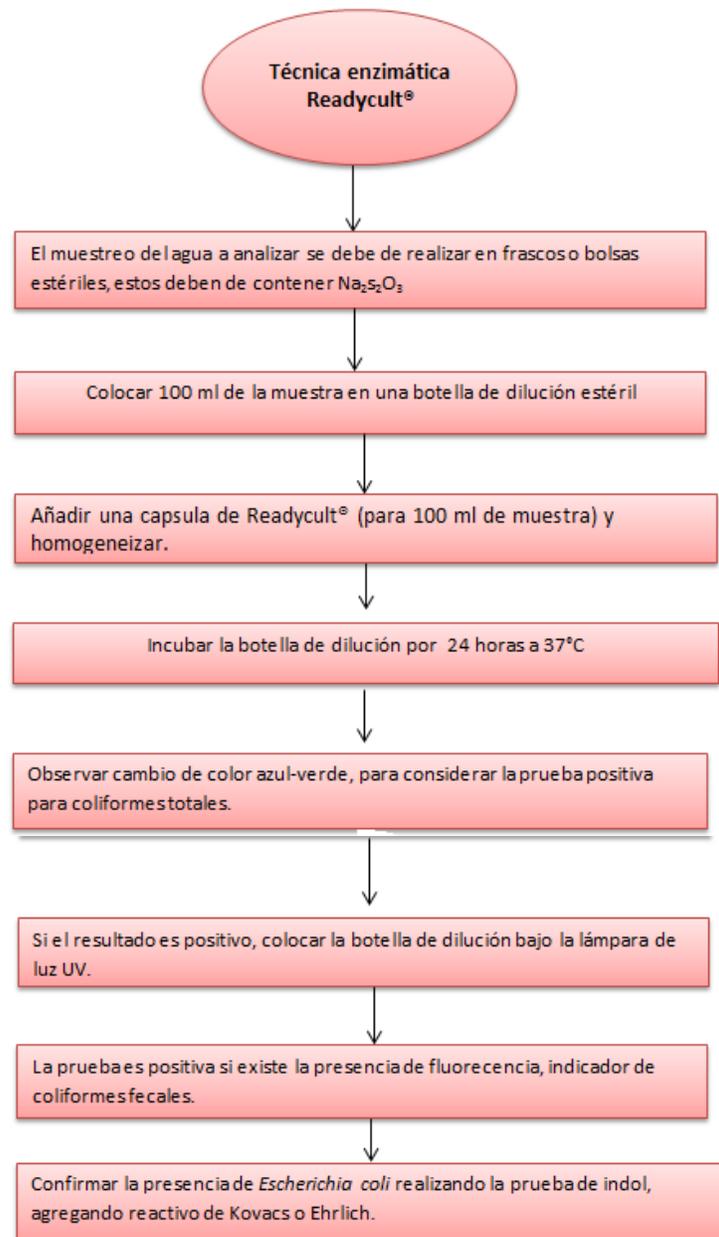


Figura 24. para la determinación de bacterias coliformes por la técnica enzimática Readycult® (Departamento de Ciencias Biológicas, 2009) Metodología de bacterias

14.6 Límites permisibles de crecimiento microbiológico para agua de proceso.

De acuerdo a la secretaria de salud, para que el agua pueda utilizarse en productos de consumo y uso humanos, esta debe de cumplir con ciertas características físicas, químicas y microbiológicas. Al obtener los resultados de los análisis microbiológicos es necesario saber si el agua de proceso analizada se encuentra dentro de los límites permisibles de crecimiento microbiológico, de lo contrario no es posible la utilización de la misma en los procesos de producción. Cuando esto ocurra es necesario la aplicación de las medidas correctivas, para que el agua utilizada en la producción del producto no presente contaminación microbiológica fuera de la especificación.

En la Tabla No.21 se muestran los límites permisibles microbiológicos conforme a lo establecido en la secretaria de salud.

Tabla 21. Límites permisibles para agua de proceso establecidos en Normas Oficiales Mexicanas (Departamento de Ciencias Biológicas, 2009)

Tipo de microorganismo	Límite
Organismos coliformes totales	Ausencia o no detectables
Coliformes fecales, <i>Escherichia coli</i> u organismos termotolerantes	Ausencia o no detectables
Mesófilos aerobios	< 100 ufc/ml
<i>Pseudonomas spp.</i>	Ausencia o no detectables

Estos límites están establecidos en las siguientes normas:

- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Modificación: 20 de Octubre del 2000.
- Norma oficial mexicana NOM-041-SSA1-1993, bienes y servicios. agua purificada envasada. especificaciones sanitarias.

CAPÍTULO 15. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO EN COSMÉTICOS

El análisis microbiológico al producto cosmético se debe de realizar en distintas partes del proceso de producción, con el fin de monitorear el producto y poder determinar fácilmente el punto crítico del proceso donde puede contaminarse. Es necesario analizar la materia prima, el granel del cosmético (producido en la planta o producido por los maquilladores) y el producto terminado. Para la determinación microbiológica en cosméticos se pueden emplear diversas técnicas de análisis. Su utilización dependerá de las herramientas proporcionadas por parte de la empresa, la urgencia de liberación del producto a causa de faltantes en los pedidos o alta demanda de un producto en específico, etc. Las técnicas de análisis que pueden utilizarse son las siguientes:

- Evidencia de crecimiento en caldo.
- Cuenta total de Mesófilos aerobios, Coliformes totales, Hongos y levaduras en placa.
- Cuenta total de Mesófilos aerobios, Coliformes totales, Hongos y levaduras en pruebas rápidas Placas 3M™ Petrifilm™.

De acuerdo a la NOM-089-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza, establece que el análisis microbiológico en cosméticos está dividido en varias etapas, las cuales se pueden interpretar como etapa cualitativa, etapa cuantitativa y de identificación. De igual forma en la NOM-089 establece el procedimiento a seguir en la dilución de la muestra de acuerdo a la naturaleza el producto cosmético. Para los cosméticos que en su formulación sean base agua se agregaran a los caldos que son empleados en dicha norma o a las soluciones diluyentes sin ningún tipo de agregado que ayude a su dilución, ya que estas muestras son miscibles en los caldos y soluciones diluyentes. Ejemplos de cosméticos base agua: Tónicos faciales, cremas para cuerpo, cremas para cara, cremas para cabello, desodorantes, talcos, sombras compactas, maquillaje en polvo compacto y rubor en polvo compacto. Para los cosméticos que no son miscibles en caldos de crecimiento o en las soluciones diluyentes se adicionará tween 80, cuya función es la emulsificación, dispersión o solubilización de las muestras que contengan en su formulación aceites, ceras o compuestos liposolubles que puedan dificultar el análisis. Ejemplos de cosméticos de naturaleza liposoluble: Labiales en barra, Correctores faciales, maquillaje en crema, Espumas fijadoras, protectores solares, rubor en barra, delineadores, etc.

15.1 Evidencia de crecimiento en caldo CLM y CDS.

La etapa cualitativa corresponde a la observación de crecimiento en distintos caldos nutritivos: Caldo letheen modificado (CLM) y Caldo dextrosa sabouraud (CDS). El procedimiento a seguir se describe en la Figura No. 25.

15.1.1 Caldo letheen modificado (CLM)

El caldo Letheen modificado (CLM) es utilizado para la determinación de crecimiento de mesófilos aerobios en cosméticos y alimentos.

Fundamento: El caldo letheen se utiliza para la determinación del contenido bacteriano en cosméticos y alimentos (su pH es de 7.0, no siendo apto para el crecimiento de hongos y levaduras). Esto es debido a su composición ya que permite una buena dispersión del inóculo además de la emulsificación de las grasas o aceites que pueda contener el cosmético e inactiva los conservadores presentes en el mismo. Como parte de su formulación se encuentra la lecitina de soya, este compuesto neutraliza los compuestos cuaternarios de amonio (Ejemplo: Cloruro de benzalconio). Durante la preparación del caldo es necesario agregar Tween 80, para neutralizar otro tipo de conservadores como los parabénos, aldehídos, fenoles, etc. Y junto con la lecitina contenida en el medio neutraliza los alcoholes (en específico el etanol). (Dibico, 2010).

15.1.2 Caldo dextrosa sabouraud (CLM)

El caldo dextrosa sabouraud (CDS), es utilizado para la determinación de crecimiento de hongos y levaduras en cosméticos y alimentos.

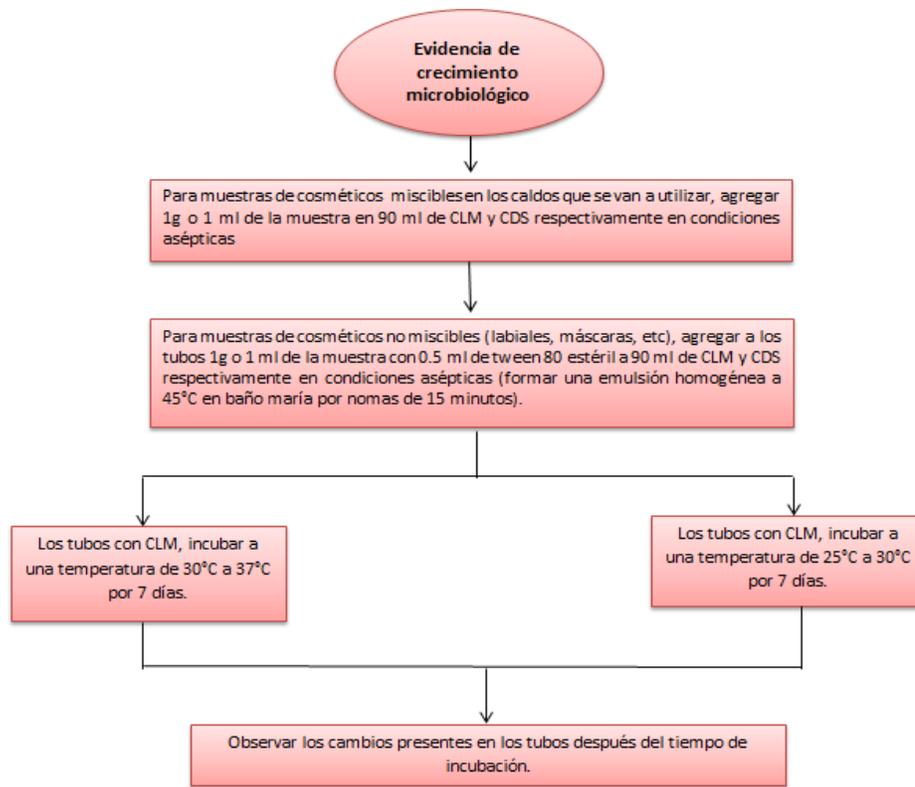


Figura 25. Metodología para la técnica de Evidencia de crecimiento microbiológico en CLM y CDS (NOM-089-SSA1-1994,1995)

Fundamento: La funcionalidad del caldo (o el agar dextrosa sabouraud) radica en el pH, las peptonas y la dextrosa que contienen ya que estos favorecen el crecimiento de hongos y levaduras.

El pH del medio es de 5.6 aproximadamente, inhibiendo parcialmente a las bacterias, además que el pH ácido es óptimo para el crecimiento de hongos y levaduras.

Las peptonas son fuentes de factores de crecimiento nitrogenados y la dextrosa proporciona energía de crecimiento para los microorganismos.

Puede agregársele al medio cloranfenicol, este es un antibiótico de amplio espectro para la inhibición de bacterias Gram (+) y Gram (-). (Dickinson, 2007).

A continuación se desglosa la interpretación de los tubos técnica de crecimiento en caldo de acuerdo a la NOM-089-SSA1-1994:

Interpretación:

- Si el tubo presenta cambios visibles como: Presencia de turbidez, olor desagradable o desprendimiento de gas, quiere decir que el producto se encuentra contaminado y es necesario realizar técnicas cuantitativas como la cuenta de microorganismos por vaciado en placa o cuenta de microorganismos en pruebas rápidas Placas 3M™ Petrifilm™.
- Si el tubo no presenta cambios se interpreta como ausentes o no detectables reportando como ausentes o no detectables. (NOM-089-SSA1-1994,1995)

15.2 Cuenta total de Microorganismos en placa.

La etapa cuantitativa corresponde a la cuenta de microorganismos ya sea en placa o en pruebas rápidas y esta solo se realiza cuando en los tubos de la prueba de crecimiento se observan cambios en el mismo. El fin de esta técnica es contar las unidades formadoras de colonia presentes en cada mililitro o gramo, para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se tienen que realizar diluciones decimales de la muestra.

Estas pruebas se deben de realizar para los siguientes microorganismos:

- Mesófilos aerobios.
- Hongos y levaduras.
- Coliformes totales.

15.2.1 Cuenta total de mesófilos aerobios en placa.

En la figura No.26 se muestra de forma breve el procedimiento para la técnica de cuenta total de microorganismos mesófilos aerobios en placa, específica para el análisis en cosméticos.

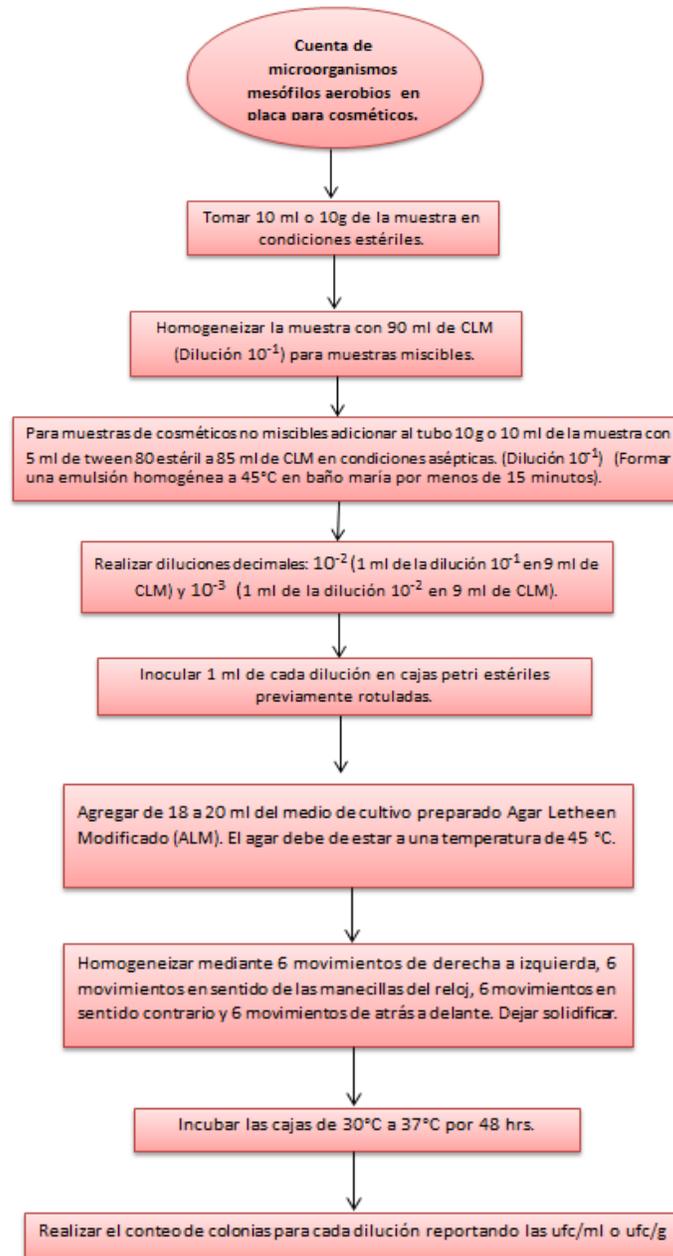


Figura 26.

Metodología para

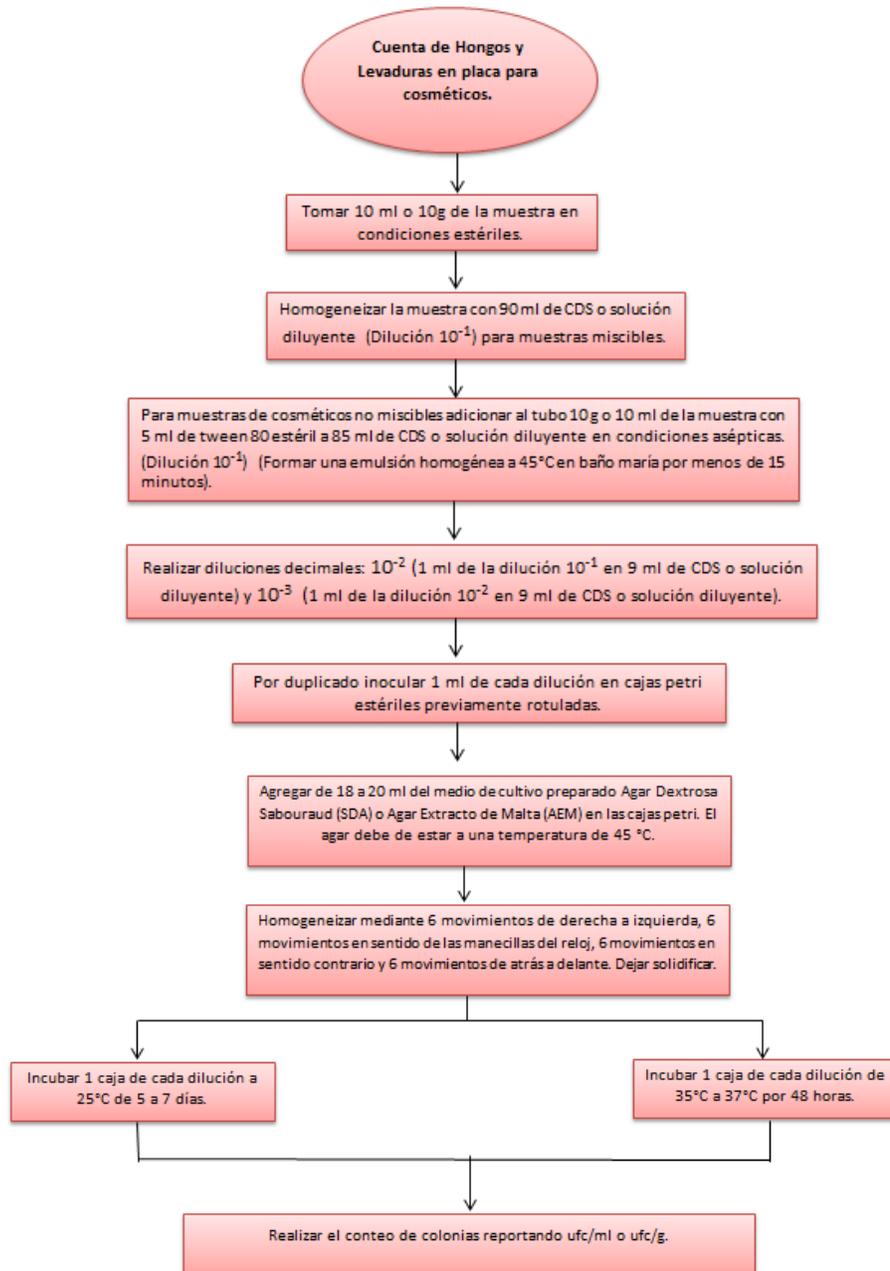
la técnica de cuenta de microorganismos mesófilos en placa para cosméticos (NOM-089-SSA1-1994,1995)

Interpretación:

- Contar las cajas en donde se encuentren de 25 a 250 UFC.
- Reportar el número de ufc/ml o ufc/g multiplicando por el inverso de la dilución observada.

15.2.2 Cuenta total de Hongos y Levaduras en placa.

En la figura No. 27 se muestra de forma breve el procedimiento para la técnica de cuenta total de hongos y levaduras, específica para el análisis en cosméticos.



Figura

27:

Metodología para la técnica de cuenta de Hongos y levaduras en placa para cosméticos. (NOM-089-SSA1-1994,1995)

Interpretación:

- Contar el número de ufc/ml o ufc/g multiplicando por el inverso de la dilución observada.
- En caso de no existir crecimiento reportar < 10 ufc/ml.

15.2.3 Cuenta total de Coliformes totales en placa.

La prueba de vaciado en placa para coliformes totales se realiza simultáneamente ya que estos deben de encontrarse ausentes en todo tipo de cosmético, y por esto es necesario detectar su presencia rápidamente para poder rechazar el lote contaminado. En la Figura No.28 se muestra el procedimiento de la cuenta de coliformes totales en placa, enfocada en el análisis de cosméticos.

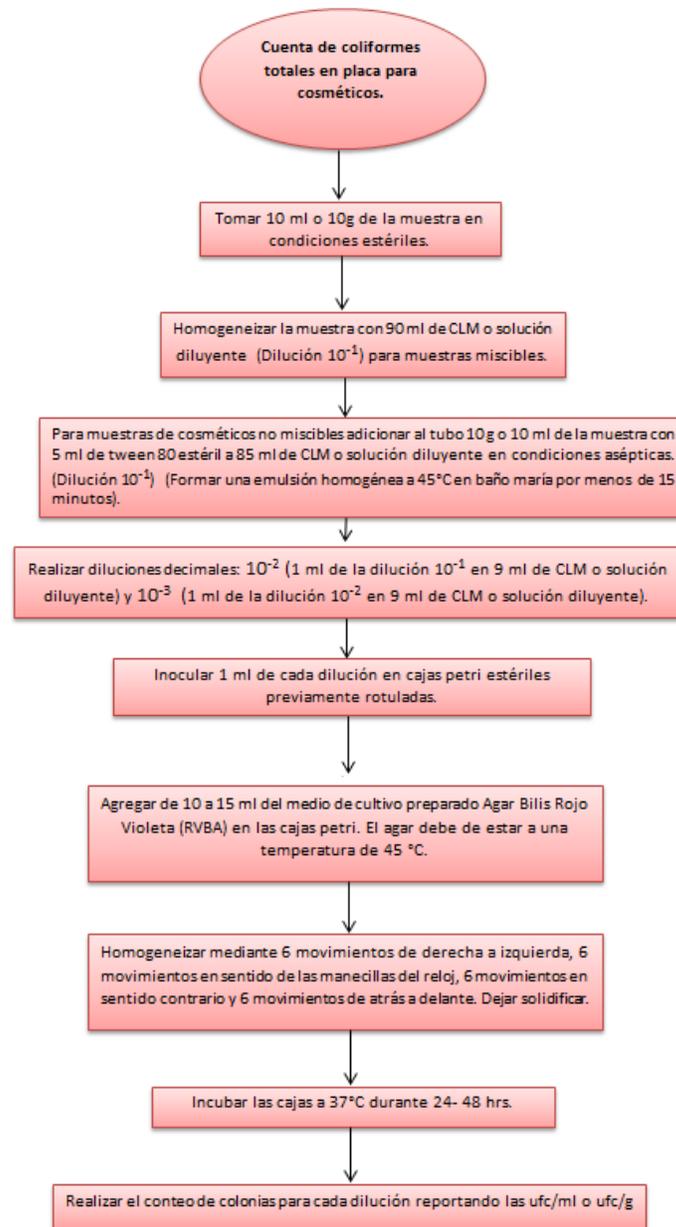


Figura 28. Metodología para la técnica de cuenta de Coliformes Totales en placa para cosméticos. (NOM-089-SSA1-1994,1995)

Interpretación:

- Seleccionar las placas que contienen entre 15 y 150 colonias.
- Reportar el número de ufc/ml o ufc/g multiplicando por el inverso de la dilución observada.
- En caso de no presentar crecimiento reportar como ausentes los coliformes totales.

Para Hongos, levaduras y coliformes totales, se puede utilizar en lugar de caldos nutritivos, soluciones diluyentes que tienen el fin de dispersar y homogenizar la carga microbiana además de facilitar la recuperación de los microorganismos. Las soluciones diluyentes que se pueden emplear son: Solución amortiguadora de fosfatos, agua peptonada o solución salina isotónica. (Camacho , Giles , Ortegón , Palao , Serrano , & Velázquez , 2009)

15.3 Cuenta total de Microorganismos en pruebas rápidas Placas 3M™ Petrifilm™.

Las pruebas rápidas placas 3M™ Petrifilm™ son de gran utilidad en la industria cosmética, permite la optimización de tiempo. El medio en el cual se realizara el análisis se encuentra deshidratado dentro de una película, sustituyendo los medios de cultivo convencionales.

Utilizando estas películas se reduce el tiempo del análisis ya que no se necesita la preparación del medio, ni la esterilización. El método que emplean estas placas es reconocido por la FDA, AOAC internacional (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales) y AFNOR (Asociación francesa de normalización). (3M™ Petrifilm™,2009)

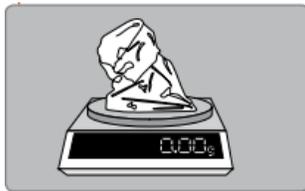
Existen diversos medios de cultivos en esta presentación, desde medios nutritivos a medios selectivos y diferenciales. Dentro de sus presentaciones podemos encontrar pruebas en las que su atributo principales el eliminar el tiempo de preparación del medio de cultivo, pero el tiempo de incubación para distintos microorganismos es igual que en lo métodos convencionales. También se pueden utilizar pruebas “Express” que además de eliminar el tiempo de preparación del medio, reducen el tiempo de incubación significativamente, la cual aumenta la productividad de la liberación del producto en el área de microbiología.

Estas pruebas se deben de realizar para los siguientes microorganismos:

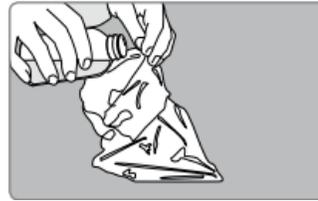
- Mesófilos aerobios.
- Hongos y levaduras.
- Coliformes totales.

15.3.1 Preparación de la muestra para el recuento de Mesófilos aerobios, Hongos, Levaduras y Coliformes totales en Placas 3M™ Petrifilm™.

A continuación en la figura No. 29 se muestra la preparación de las diluciones de muestras para el análisis microbiológico en placas 3M™ Petrifilm™:



Tomar 1 g o 1 ml de la muestra en condiciones estériles.

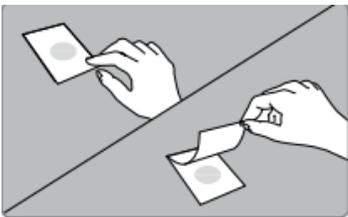


Homogeneizar la muestra en 9 ml de solución diluyente.

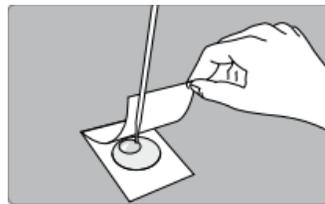
Figura 29. Preparación de diluciones de muestras cosméticas para placas 3M™ Petrifilm™ (3M™ Petrifilm™,2009) (3M™ Petrifilm™, 2001) (3M™ Petrifilm™,2000)

15.3.2 Siembra de la muestra para recuento de Mesófilos aerobios, Hongos, Levaduras y coliformes totales en Placas 3M™ Petrifilm™.

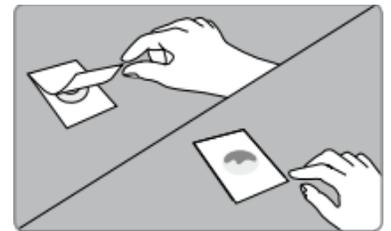
En la figura No. 30 se muestra el procedimiento descrito para la siembra de microorganismos (Mesófilos aerobios, Hongos, Levaduras, Coliformes totales, etc) en placas Petrifilm™:



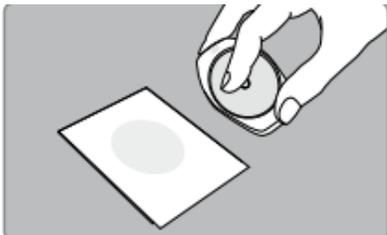
En condiciones estériles colocar la placa Petrifilm en una superficie plana y levantar la película superior.



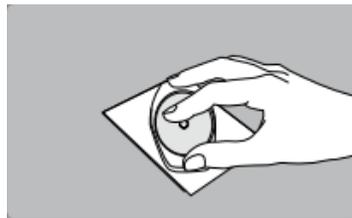
Agregar 1 ml de la muestra en el centro de la placa, manteniendo la pipeta en posición vertical, cuidando de no tocar el medio deshidratado.



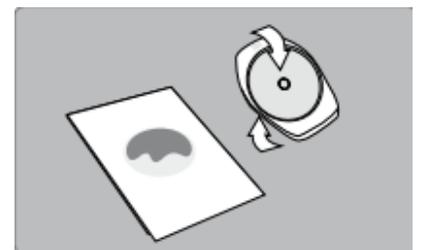
Dejar caer la película o film superior sin levantar el fin o deslizar hacia abajo.



Levantar el aplicador y esperar 1 minuto para que el agar solidifique.



Aplicar presión de manera suave con el aplicador, con el fin de distribuir el inóculo. No mover el aplicador.



Colocar el aplicador en la película superior, sobre el inóculo.

Figura 30. Metodología para la siembra en placas 3M™ Petrifilm™ (3M™ Petrifilm™,2009) (3M™ Petrifilm™, 2001) (3M™ Petrifilm™,2000)

15.3.3 Incubación de las Placas 3M™ Petrifilm™ para recuento de Mesófilos aerobios, Hongos, Levaduras y Coliformes Totales.

Las especificaciones para una adecuada incubación de las muestras, dependerá del tipo de microorganismo que se busque aislar, en la Tabla No.22 se describen estas condiciones de incubación conforme al tipo de microorganismo que se pretende su crecimiento

Tabla 22. Condiciones de incubación para placas 3M™ Petrifilm™ dependiendo del tipo de microorganismo sembrado.

Tipo de Microorganismo	Especificaciones
Organismos Mesófilos aerobios	<ul style="list-style-type: none"> • Colocar en la incubadora las placas Petrifilm cara arriba apiladas en grupos de no más de 20 placas. • Incubar de 30°C a 37°C por 72 horas. (3M™ Petrifilm™,2009) <p>Para placas de recuento exprés:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Las placas se incuban de 30 °C a 37°C por 24 horas. (3M™ Petrifilm™,2015)
Hongos (Mohos) y Levaduras	<ul style="list-style-type: none"> • Colocar en la incubadora las placas Petrifilm cara arriba apiladas en grupos de no más de 20 placas. • Incubar a 25°C durante 3- 5 días. (3M™ Petrifilm™,2000) <p>Para placas de recuento exprés:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Las placas se incuban de 25°C a 28°C por 48 horas. (3M™ Petrifilm™,2013)
Coliformes Totales y Fecales	<p>Coliformes Totales:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colocar en la incubadora las placas Petrifilm cara arriba apiladas en grupos de no más de 20 placas. • Incubar a 37°C ± 1°C 24 horas. <p>Coliformes Fecales:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Colocar en la incubadora las placas Petrifilm cara arriba apiladas en grupos de no más de 20 placas. • Incubar a 44°C ± 1°C 24 horas. (3M™ Petrifilm™,2001)

15.3.4 Interpretación de las Placas 3M™ Petrifilm™ para recuento de Mesófilos aerobios, Hongos, Levaduras y Coliformes Totales.

15.3.4.1 Interpretación para recuento de Mesófilos aerobios.

Para poder realizar una correcta lectura de las placas Petrifilm™ es necesario utilizar la guía de interpretación de las mismas, descrito por la empresa 3M™.

En las figuras No. 31, 32 y 33 se muestran los principales ejemplos de crecimiento de mesófilos aerobios en las placas Petrifilm 3M™ Petrifilm™:

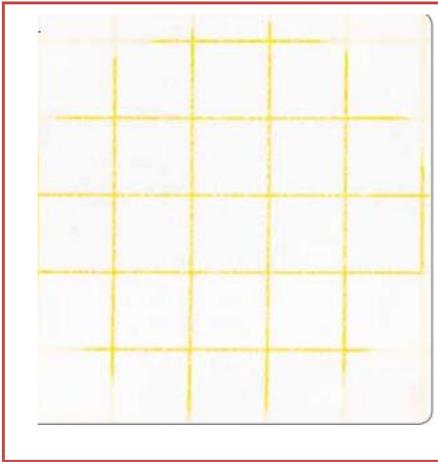


Figura 31. Recuento 0, Placa Petrifilm para recuento de Mesófilos aerobios sin colonias. (3M™ Petrifilm™, 2009)

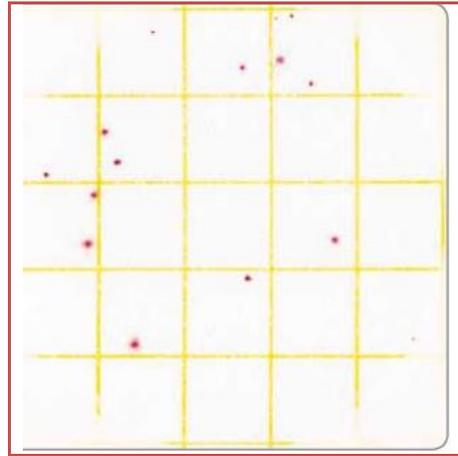


Figura 32. Recuento 16. El indicador presente en la placa pigmenta todas las colonias. Contar todas las colonias rojas independiente del tamaño. (3M™ Petrifilm™, 2009)

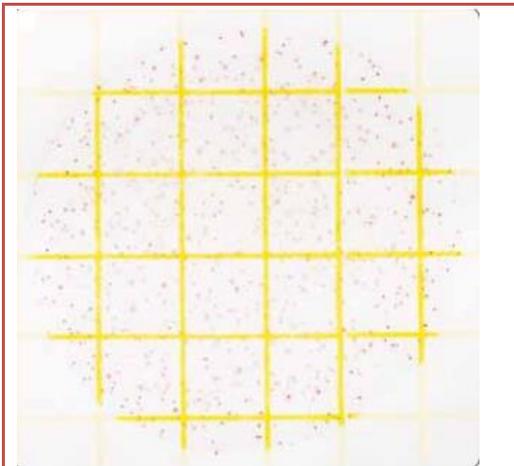


Figura 33. Recuento 420, en placas cuyo número de colonias es mayor a 300, contar las colonias que se encuentran en una cuadrícula y multipolar por 20 para tener el recuento total. (3M™ Petrifilm™, 2009)

15.3.4.2 Interpretación para recuento de Hongos y

Levaduras

Para diferenciar las colonias de levaduras y hongos en las placas Petrifilm™, es necesario observar las siguientes características típicas para cada uno de estos:

Para levaduras:

- Colonias pequeñas
- Colonias con bordes definidos
- El color presente en las colonias será de rosa a azul-verdoso
- Colonias alzadas (3D)

(3M™ Petrifilm™, 2000)

Para Hongos:

- Colonias grandes
 - Las colonias presentan bordes difusos
 - El color de las colonias pueden ser variables, algunos hongos pueden producir pigmentos
 - Colonias planas
 - Generalmente presenta un foco en el centro de las colonias.
- (3M™ Petrifilm™,2000)

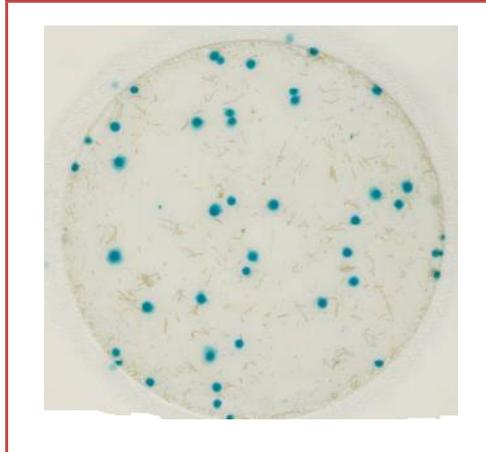


Figura 34. Recuento 44, Placa Petrifilm para recuento de Levaduras.
(3M™ Petrifilm™,2000)

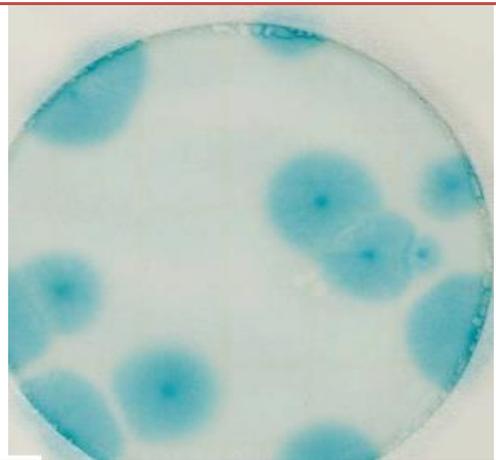
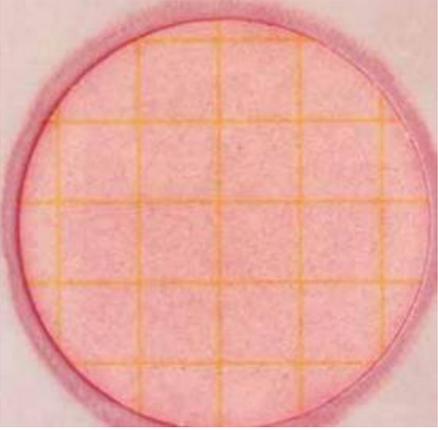
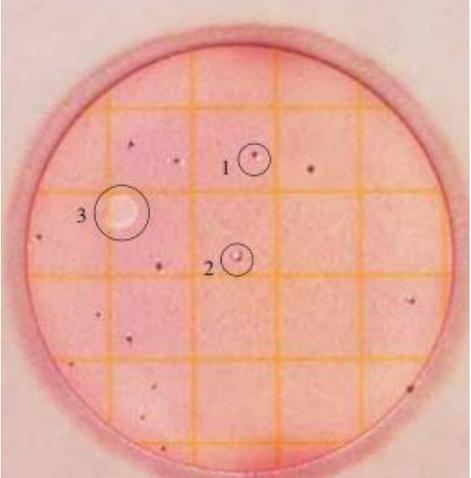
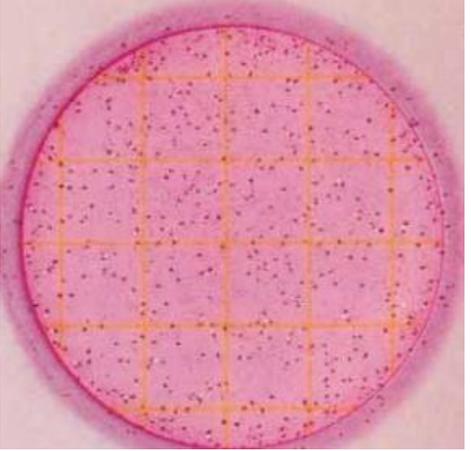


Figura 35. Recuento 12, Placa Petrifilm para recuento de Hongos. (3M™ Petrifilm™,2000)

15.3.4.3 Interpretación para recuento de Coliformes Totales.

En la tabla No.23 se muestran los principales ejemplos de crecimiento de mesófilos aerobios en las placas Petrifilm 3M™ Petrifilm™:

Tabla 23. Interpretación para las placas 3M™ Petrifilm™ de coliformes totales en sus formas de crecimiento habituales (3M™ Petrifilm™,2001)

Tipo de crecimiento	Interpretación.
	<p>Recuento de colonias: 0</p> <p>Las burbujas que se forman en el fondo son una característica del gel, son burbujas pequeñas o puntiformes, no son resultados de crecimiento por coliformes.</p>
	<p>Recuento de colonias: 15</p> <p>Los coliformes como producto metabólico producen gas, formando burbujas alrededor del diámetro de la colonia en distintas proporciones como se puede observar en la imagen. De igual forma, se pueden observar colonias sin la presencia de burbujas de gas.</p>
	<p>Recuento estimado: 310</p> <p>Cuando el número de colonias excede de 300 contar el número de colonias presentes en un cuadrante y después multiplicar por 20, que es número aproximado presentes en la placa Petrifilm.</p> <p>No se deben de contar las colonias que se encuentren en la zona blanca, ya que no se encuentran en el medio selectivo.</p>

15.3.5 Almacenamiento adecuado para las placas 3M™ Petrifilm™

Para que las placas Petrifilm puedan proporcionar resultados confiables, tienen que estar en buenas condiciones de almacenamiento antes y después de ser abiertas lo cual estas condiciones se muestran en la figura No.36:

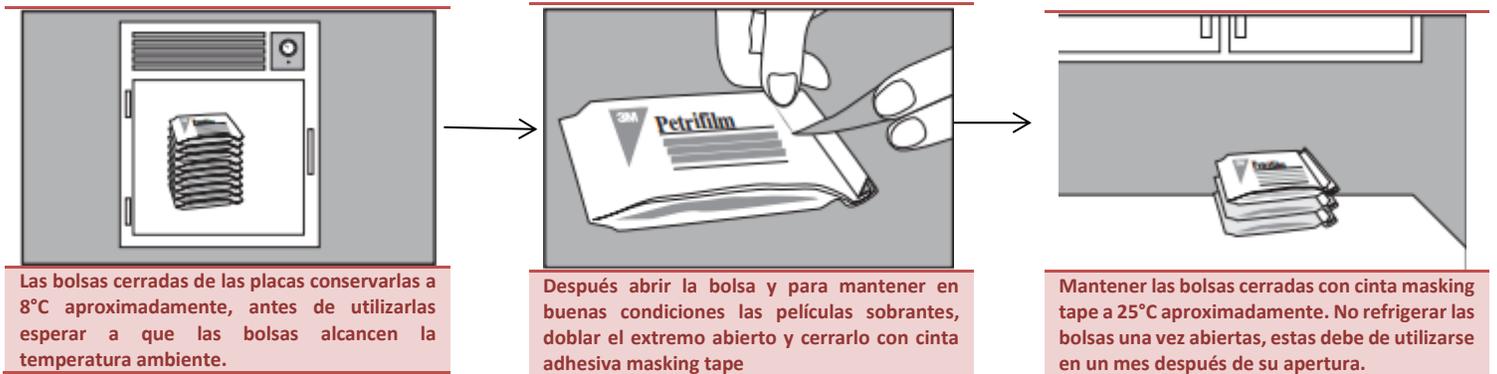


Figura 36. Condiciones adecuadas de almacenamiento para las bolsas de placas 3M™ Petrifilm™ (Petrifilm™, Guía de Interpretación, 2009) (Petrifilm™ 3. , Guía de Interpretación, 2001) (Petrifilm™ 3. , Guía de interpretación , 2000)

15.4 Etapa de identificación

En la NOM-089 está descrito que después de encontrar resultados positivos en cualquiera de los análisis cualitativos y cuantitativos es necesaria la identificación de especies de microorganismos que se encuentran contaminando el producto cosmético mediante:

- Resiembra del microorganismo contaminante en medios de cultivo nutritivos con el fin de realizar tinciones para la diferenciación morfológica microscópica (Tinción de Gram, Shaeffer-Fulton, azul de algodón lactofenol).
- Con las colonias desarrolladas en los medios nutritivos realizar las pruebas bioquímicas primarias y secundarias establecidas para la identificación de cada género y especie.
- Resiembra del microorganismo contaminante en medios selectivos y diferenciales, ya sea en medios de cultivo convencionales o en placas 3M™ Petrifilm™.

CAPÍTULO 16. LÍMITES MICROBIOLÓGICOS PERMISIBLES EN COSMÉTICOS

De acuerdo a la secretaria de salud, los productos cosméticos, deben de cumplir con ciertas características físicas, químicas y microbiológicas. En la Tabla No. 24 se muestran los límites permisibles microbiológicos conforme a lo establecido en la secretaria de salud. Al expedir resultados microbiológicos sin presencia de crecimiento no es correcto reportar cero, la forma correcta es reportar con signo de menor que (<) y la menor dilución utilizada de acuerdo con la NOM 089 es 10^{-1} .

**Tabla 24. Límites permisibles para cosméticos (NOM-089-SSA1-1994,1995)
(Espinosa, 2001)**

Tipo de microorganismo	Limite
Organismos coliformes totales y coliformes fecales o termotolerantes	Ausencia o no detectables
Organismos Patógenos	Ausencia o no detectables
Mesófilos aerobios	< 10 ufc/ml
Hongos y levaduras	< 10 ufc/ml

CAPÍTULO 17. BITÁCORA DE ANÁLISIS Y EMISIÓN DE DICTAMEN MICROBIOLÓGICO

Los documentos y formatos son una parte indispensable dentro del sistema de gestión de calidad de todas las empresas.

De acuerdo con ISO 9000:2005 un documento se define como: “La información y su medio de soporte”, es decir todo tipo de información acerca del sistema de gestión de calidad así como su medio de revisión. Ya sea en papel, soporte electrónico, en fotografía etc. (ISO9000:2005, 2014). Un documento describe como llevar a cabo una actividad, están sujetos a cambio y su tiempo de conservación no está definido. Ejemplos de documentos son los procedimientos establecidos por la empresa o instrucciones de trabajo (Documentación técnica).

Un formato se define como: “Un documento que presenta resultados obtenidos o proporciona evidencia de actividades realizadas” (ISO9000:2005, 2014), por lo tanto todos los formatos son un documento, pero un documento no siempre será un formato.

Un formato nos permite demostrar con pruebas de conformidad que el procedimiento de análisis se realizó conforme se ha establecido por los sistemas de calidad, así como su realización en tiempo y forma a partir de la recepción de la muestra. Estos formatos deberán mantenerse legibles, identificables y recuperables por un tiempo determinado por la misma empresa. (ISO9001, 2011)

Tabla 25. Información mínima necesaria para el registro de muestras en bitácora

Mes en el que se realizan los análisis																
No. Consecutivo de análisis	Código del producto	Descripción del producto	Lote	Cantidad fabricada	Proveedor (en caso de tener maquilador)	Fecha de recepción	Fecha de siembra	Fecha de Lectura	Cuenta de Mesófilos ufc/ml	Cuenta de Hongos ufc/ml	Cuenta de Levaduras ufc/ml	Cuenta de Coliformes totales ufc/ml	Analista	Dictamen	Observaciones	

17.1 Bitácora de análisis microbiológico

Al ingresar a análisis microbiológico una muestra, esta debe de documentarse en el formato de análisis. El registro se realizará en una bitácora escrita o electrónica. Dicha bitácora deberá de tener el código/folio de identificación único para ese formato establecido por la empresa. Las hojas de la bitácora deben de estar divididas en columnas para que el llenado de información sea en sentido horizontal, como se muestra en la Tabla No.25:

17.2 Emisión de dictamen microbiológico y certificado de análisis.

Una vez finalizado el tiempo de incubación de la muestra se deberá emitir un dictamen aprobatorio o bien de rechazo según sea el caso. Dicho dictamen debe de contener los siguientes elementos mínimos:

- Código del producto.
- Descripción del producto.
- Lote.
- Cantidad fabricada.
- Maquilador (en el caso que aplique).
- Fecha de recepción de la muestra.
- Fecha de siembra y Fecha de lectura.

- Cuenta de Mesófilos aerobios (reportadas como ufc/ml).
- Cuenta de Hongos (reportadas como ufc/ml).
- Cuenta de Levaduras (reportadas como ufc/ml).
- Cuenta de Coliformes Totales (reportadas como ufc/ml).
- Dictamen
- Analista

Para reducir el tiempo de liberación, o en su caso facilitar la retención del producto cuando este no cumpla con las especificaciones establecidas, la emisión del dictamen se efectuará por la base de datos interna o bien en el sistema de mensajería electrónica de la empresa.



Fecha de expedición:

REPORTE DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Fecha de Recepción de la muestra:

Fecha de Siembra:

Fecha de Lectura:

Datos de la muestra analizada:

Descripción de la muestra:	
Lote:	
Cantidad fabricada:	
Maquilador: (cuando aplique)	
<i>Propiedades organolépticas:</i>	
Color:	
Olor:	
Apariencia:	
<i>Resultados microbiológicos:</i>	
Cuenta de Mesófilos aerobios ufc/ml	
Cuenta de Hongos ufc/ml	
Cuenta de Levaduras ufc/ml	
Cuenta de Coliformes totales ufc/ml	

Identificación de microorganismos contaminantes: Aplica en caso de rechazo por contaminación

Dictamen:

Método utilizado:

Especificaciones:

Observaciones:

Químico analista

Vo. Bo. Jefe de Control de Calidad

Nombre y Firma

Nombre y Firma

Folio de identificación

Informando del dictamen a todos los departamentos involucrados con la liberación y distribución del producto (Almacén, Operaciones, Planeación, Administración de la demanda, Jefe de control de calidad, etc). Posteriormente se generará un reporte de análisis microbiológico, este registro funciona como evidencia de realización de la prueba establecida por el proceso interno (análisis microbiológico). El reporte de análisis deberá contener los elementos mínimos mostrados en la figura No. 37 (Universidad de Oriente Puebla, 2010)

Figura 37. Formato de reporte de análisis microbiológico (Universidad de Oriente Puebla, 2010)

Los reportes de análisis son un formato sujeto a auditoria, estos deben de contar con un sistema de almacenamiento ordenado, de fácil acceso en caso de ser requerido. El cual contará con un periodo de retención, establecido por el sistema de gestión de calidad de la empresa.

CAPÍTULO 18. MANEJO Y DESECHO ADECUADO DE RPBI EN LA INDUSTRIA COSMÉTICA

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI) tienen como definición según la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental- Residuos peligrosos biológico-infeccioso- Clasificación y especificaciones de manejo: “Aquellos materiales generados durante los servicios de atención médica, que contengan agentes biológico-infecciosos y que puedan causar efectos nocivos a la salud y el ambiente” (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, 2003)

Para que los residuos sean considerados RPBI, estos deben de poseer características específicas las cuales son:

- Contener un agente patógeno (biológico-infeccioso).
 - Este patógeno debe encontrarse en concentración suficiente para producir daño.
 - Debe de encontrarse en un ambiente propicio para su mantenimiento.
 - Puede acceder fácilmente por una vía de entrada.
 - Puede entrar en contacto con un hospedero susceptible, pudiendo causar efectos nocivos a la salud y el ambiente.
- (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2007)

En esta norma se encuentra especificado el manejo adecuado de los RPBI, en cual consta de varias etapas las cuales son:

- Clasificación.
- Envasado.
- Almacenamiento temporal.
- Recolección.
- Transporte interno y externo.
- Disposición final.

18.1 Clasificación de RPBI y de establecimientos generadores.

Es importante conocer la clasificación de los RPBI, en base a esto se establece que el área de control de calidad microbiológico en cosméticos se encuentra únicamente en la clasificación 2 (cultivos y cepas de agentes infecciosos), como se muestra en la tabla No.26. Solo se encuentra en esta clasificación por que solo se generan residuos relacionados con el manejo y análisis de microorganismos.

De igual forma es necesario tener en cuenta en que nivel de clasificación se encuentra la empresa en el que se labora como se muestra en la tabla No. 27, ya que de esta clasificación depende el tiempo máximo de almacenamiento temporal que la norma establece para estos residuos.

Tabla 26. Clasificación de establecimientos generadores de RPBI de acuerdo a la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002

Tipo de nivel	Especificaciones
Nivel I	<ul style="list-style-type: none"> • Unidades hospitalarias de 1 a 5 camas e instituciones de investigación con excepción de los señalados en el Nivel III. • Laboratorios clínicos y bancos de sangre que realicen análisis de 1 a 50 muestras al día. • Unidades hospitalarias psiquiátricas. • Centros de toma de muestras para análisis clínicos.
Nivel II	<ul style="list-style-type: none"> • Unidades hospitalarias de 6 hasta 60 camas. • Laboratorios clínicos y bancos de sangre que realicen análisis de 51 a 200 muestras al día. • Bioterios que se dediquen a la investigación con agentes biológico-infecciosos. • Establecimientos que generen de 25 a 100 kilogramos al mes de RPBI.

Nivel III	<ul style="list-style-type: none"> • Unidades hospitalarias de más de 60 camas. • Centros de producción e investigación experimental en enfermedades infecciosas. • Laboratorios clínicos y bancos de sangre que realicen análisis a más de 200 muestras al día. • Establecimientos que generen más de 100 kilogramos al mes de RPBI.
------------------	---

Tabla 27. Clasificación de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos de acuerdo a la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002

Tipo de residuo	Especificaciones
1. La sangre	Sangre completa y los componentes de la misma: Solo en su forma líquida, incluyendo células hematopoyéticas, fracciones celulares y hemoderivados.
2. Cultivos y cepas de agentes biológico-infecciosos	Todos los cultivos generados en procedimientos de diagnóstico e investigación. Así como los generados en la industria (producción) y control de agentes biológico-infecciosos. Utensilios desechables usados para contener, transferir, inocular y mezclar cultivos de agentes biológico-infecciosos.
3. Patológicos	Tejidos, órganos y partes que se extirpan o remueven durante las necropsias, la cirugía o algún otro tipo de intervención quirúrgica, que no se encuentren en formol. Así como también muestras biológicas para análisis químico, microbiológico, citológico e histológico. Cadáveres y partes de animales que fueron inoculados con agentes enteropatógenos en centros de investigación y bioterios.
4. Residuos no anatómicos	Recipientes desechables saturados con sangre líquida o con algunos fluidos corporales como: líquido sinovial, líquido pericárdico, líquido pleural, líquido Céfal-Raquídeo o líquido peritoneal. Materiales desechables que contengan esputo, secreciones pulmonares y cualquier material usado para contener esto.
5. Objetos punzocortantes	Materiales que hayan estado en contacto con humanos o animales o sus muestras biológicas durante el diagnóstico y tratamiento, únicamente: tubos capilares, navajas, lancetas, agujas de jeringas desechables, agujas hipodérmicas, de sutura, de acupuntura y para tatuaje, bisturís y estiletos de catéter

18.2 Envasado adecuado de RPBI

El área de microbiología del control de calidad en cosméticos, es la encargada de la generación de RPBI en la empresa y por esta razón el Químico analista encargado del área debe de tener conocimiento del tipo de envasado que deben de tener estos residuos de acuerdo a la clasificación en base a su origen, esto se muestra en la Tabla No.28:

Tabla 28. Disposición de envasado para RPBI de acuerdo a la NOM-087-SEMARNAT-SSA1 2002

Tipo de residuos	Estado físico	Envasado	Color	Tipo de envase
Sangre	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo	
Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos (Agar)	Bolsas de polietileno	Rojo	
	Líquidos (Caldos)	Recipientes herméticos	Rojo	
Patológicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo	
	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo	
Residuos no anatómicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo	
	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo	
Objetos punzocortantes	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo	

Todas las bolsas o recipientes en donde se desechen los residuos de los análisis microbiológicos deberán estar marcadas con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda “Residuos Peligrosos Biológico- Infecciosos”, como se muestra en la Figura No. 38:



Para el correcto envaso de los RPBI, las bolsas en donde son vaciados estos residuos debe de estar en un límite máximo a 80% de su capacidad total, cerrando con un nudo o cinta adhesiva para evitar que estos salgan, una vez cerradas las bolsas estas no podrán ser abiertas o vaciadas.

18.3 Almacenamiento temporal.

Dentro de la empresa deberá de destinarse un área donde será el almacenamiento temporal de RPBI ya envasados, los cuales deberán resguardarse en contenedores de metal o de plástico con tapa, que no obstruyan el paso y deberán estar rotulados con el símbolo universal de riesgo biológico, incluida la leyenda: "Residuos Peligrosos Biológicos-Infecciosos".

El área de almacenamiento temporal debe de contar con señalamientos y letreros alusivos al peligro en un lugar visible, el manejo y accesos a estas áreas debe de estar restringido, donde solo podrán manipular y tener acceso personal capacitado. En la Figura No.39 se muestra un contenedor temporal para RPBI:



**Figura 39. Contenedor de plástico temporal para RPBI
(Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2007)**

Existen instituciones como FDA que piden como requisito antes del envasado que todo el RPBI producido por los análisis de control de calidad deberá de someterse a esterilización, si la empresa cosmética no exporta productos a Estados Unidos, basta únicamente con seguir con las disposiciones de la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

El periodo de almacenamiento temporal dependerá de en qué nivel de generador se encuentra la empresa, el periodo máximo de almacenamiento se muestra en la Tabla No.29:

Tabla 29. Periodo de almacenamiento de RPBI (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, 2003)

Tipo de nivel	Periodo de tiempo
Nivel I	Máximo 30 días.
Nivel II	Máximo 15 días.
Nivel III	Máximo 7 días.

17.4 Recolección de RPBI

La recolección de los RPBI se lleva a cabo por empresas especialistas en este ramo que además de encargarse de la recolección también realizan todos los procesos de tratamiento final de los mismos. Estas empresas deberán estar autorizadas por la SEMARNAT, la cual verifica que los procesos de recolección y disposición final de los RPBI por parte de la empresa sean los establecidos por la NOM-087. (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, 2003)

Al momento de la recolección de residuos por parte del área de control de calidad microbiológico debe de garantizar que los RPBI se encuentren envasados de acuerdo a las disposiciones establecidas en la NOM-087, de no cumplir esto, la empresa encargada de la recolección y disposición final de los mismos no podrá recolectarlos en tiempo y forma.

El Químico analista en microbiología también deberá asegurarse que al momento de la recolección de los RPBI el personal encargado de esta tarea cumpla con los siguientes requerimientos.

- Llevar puesto el equipo de protección personal pertinente (Bata o ropa de protección, cofia, lentes de seguridad, cubrebocas, guantes, botas de seguridad).
- Llevar consigo dispositivos para el manejo adecuado de los RPBI (No debe de llevar las bolsas de envasado cargando).
- Tener el conocimiento del manejo adecuado de los RPBI para su recolección.
- Tener el conocimiento de los diferentes tipos de envases para cada tipo de residuo.

16.5 Tratamiento y disposición final de RPBI

Para esta parte del proceso el área de control de calidad microbiológico de la empresa ya no tiene injerencia. Para su disposición final se contrata una empresa encargada de tratar los residuos por medio de métodos físicos y químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos.

Para la disposición final de los RPBI tratados e irreconocibles, se dispondrán como residuos no peligrosos en sitios autorizados por las autoridades competentes. (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, 2003)

CONCLUSIÓN

De acuerdo con la información recabada a partir de referencias escritas y electrónicas podemos constatar lo imprescindible que es cumplir en el laboratorio de control de calidad microbiológico con todos los requerimientos operacionales y las metodologías de análisis descritas por instituciones regulatorias nacionales e internacionales para poder asegurar un producto cosmético final seguro.

El Químico de microbiología debe de conocer estrictamente los aspectos normativos que requiere el control de calidad microbiológico con el fin de emitir resultados de análisis representativos y confiables que proporcionen un producto cosmético funcional y con garantía de seguridad para el consumidor.

La industria cosmética en México ha tenido un crecimiento significativo a lo largo de los años por lo cual se está convirtiendo en una fuente laboral alternativa. Este trabajo de investigación proporciona una guía útil para el estudiante o recién egresado, el cual busque desarrollarse en esta área de la industria en incremento.

REFERENCIAS

- Acedo, A. (s.f.). *Gobierno de Extremadura* . España : Instituto CMC .
- Acosta, S. (2005). *Enterococcus* . Argentina : CODEINEP .
- Aguirre Mejía, A. L. (2015). *Calificación de Equipos*. Mexico : Congreso Interamericano para la acreditación de Laboratorios Clínicos, Bancos de Sangre y Células progenitoras Hematopoyéticas. .
- Alpizar Ramos, M. d. (2015). *Cosmetología*. Recuperado el 04 de Junio de 2016, de Facultad de Química UNAM: <http://slideplayer.es/slide/3428594/>
- Alvarado, C. (31 | de Agosto de 2013). *Henry Ford y sus aportes a la administracion* . Recuperado el 2016 de Abril de 12, de Prezi: <https://prezi.com/7vz8tt0f7jtr/henry-ford-y-sus-aportes-a-la-administracion/>
- Anmat Administración nacional de medicamentos, a. y. (2014). *Análisis microbiológico de los alimentos, Microorganismos indicadores* . Argentina : Red nacional de laboratorios oficiales de análisis de alimentos.
- APPCC, A. d. (2015). *MANUAL DEL SISTEMA APPCC GUÍA DE CORRECTAS PRÁCTICAS DE HIGIENE*. Recuperado el 10 de Julio de 2016, de Guía de correctas practicas de higiene: <http://www.analizacalidad.com/docftp/fi1139higiene.htm>
- Arastegui , B. (2002). *Candida albicans* (Robin) Berkhout. *Revista Iberoamericana de Micología* , 25-26.
- Argentina, F. B. (24 de Abril de 2014). *Penicillium* . Recuperado el 03 de Julio de 2016, de FDA.ORG : <http://www.fba.org.ar/panel-gestion/InformeResultado/MI/mi31.pdf>
- Avalos, J. M. (1999). *La Microbiología como Ciencia* . Salamanca : Departamento de Microbiología y genética .
- Becton Dickinson. (Marzo de 2007). *BBL Sabouraud Dextrose Agar* . Recuperado el 02 de Agosto de 2016 , de Procedimientos de control de calidad : [https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007492\(08\)\(0307\)_ES.pdf](https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007492(08)(0307)_ES.pdf)
- Burchard Señoret, L. (13 de Abril de 2008). *Coliformes* . Recuperado el 22 de Junio de 2016, de Slideshare : <http://es.slideshare.net/lucasburchard/coliformes>
- Camacho , A., Giles , M., Ortegón , A., Palao , M., Serrano , B., & Velázquez , O. (2009). *Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico* . México: Facultad de Química, UNAM .
- Camacho , A., Giles , M., Palao , M., Serrano , B., & Velázquez , O. (2009). *Técnicas para el análisis microbiológico en alimentos*. México: Facultad de química, UNAM.
- Camacho, A., Giles, M., Palao, M., Serrano, B., & Velázquez, O. (2009). *Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y Escherichia coli por la técnica de*

diluciones en tubo múltiple (Número más Probable o NMP) . México: Facultad de Química UNAM.

CANIPEC. (2014). *Memoria Estadística* . Recuperado el 30 de Octubre de 2016 , de http://www.canipec.org.mx/woo/xtras/Presentaci%C3%B3n%20ejecutiva_anuario%202014.pdf

CANIPEC. (2016). *CANIPEC*. Recuperado el 30 de MAR de 2016, de http://www.canipec.org.mx/woo/index.php?option=com_content&view=article&id=5&Itemid=2

Centro Nacional de Metrología. (2012). *Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados*. España : Ministerio de Industria, Energía y Turismo .

Carrillo , A., Brió, S., & Cárdenas , C. (2002). *Infecciones fungicas superficiales por levaduras y sertaconazol* . Peru: Dermatol .

Carrillo, L. (20 de Diciembre de 2013). *Los hongos de los alimentos y forrajes* . Recuperado el 03 de Julio de 2016, de Penicillium: <http://web.archive.org/web/20111215095918/http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/05htextopenicilios.pdf>

Casado González, M. C., Torruco Cabezas , G., & Medina Anguita , M. (2012). *Medios de Cultivo en un Laboratorio de Microbiología*. España : Wordpress.

Castrillón Rivera , L., Palma Ramos , A., & Padilla Desgarenes, C. (2005). Factores de virulencia de *Candida sp* . *Dermatología*, 12-27.

Cerra , H., Fernandez , M. C., Horak , C., Lagomarsino , M., Torno, G., & Zarankin , E. (2013). *Manual de Microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos* . Buenos Aires : División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos .

Claude Martini, M., & Chivot, M. (1997). *Dermocosmética y Estética* . España : Masson.

Coast, P. (29 de Abril de 2016). *Staphylococcus aureus* . EUA.

Del Rayo Salinas, M. (20 de Marzo de 2009). *Coordinación de Seguridad, Prevención de Riesgos* . Recuperado el 29 de Mayo de 2016 , de Facultad de Química UNAM : <http://depa.fquim.unam.mx/pcivil/>

Departamento de Ciencias Biológicas UNAM (2009). *Manual de prácticas Microbiología Farmacéutica* . México : Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán .

Departamento de Ciencias Biológicas (2011). *Guía de trabajos prácticos Microbiología* . Chile : Universidad Andres Bello .

- Departamento de Físicoquímica, UNAM. (09 de Mayo de 2012). *Microorganismos indicadores* . Recuperado el 22 de Junio de 2016 , de UNAM: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/2Indicadores_6422.pdf
- Diario Oficial de la Federación. (05 de Febrero de 2016). *NOM-059-SSA1-2006*. Recuperado el 24 de Abril de 2016 , de Buenas practicas de fabricacion para establecimientos de la industria quimico farmaceutica dedicados a la fabricacion de medicamentos. : dof.gob.mx/nota_to_doc.php?codnota=5424575
- Dibico. (2010). *Caldo Lethen Modificado* . Recuperado el 02 de Agosto de 2016 , de Catálogo 1284: <http://www.dibico.com/fichast/1284.pdf>
- El crisol, S.A. de C.V. (13 de Diciembre de 2010). *Catalogo Crisol* . Recuperado el 26 de Abril de 2016, de https://issuu.com/chr01/docs/cat_logo_crisol/144
- Escalante, E. (2008). *Seis Sigma* . México : Limusa .
- Espinosa, R. E. (2001). *Control de calidad en un laboratorio microbiologico de la industria de productos cosmeticos* . Mexico : Exámenes profesionales, Facultad de Química .
- Facultad de Ingeniería.(2009). *UNAM*. Recuperado el 12 de Abril de 2016, de http://www.ingenieria.unam.mx/industriales/historia/carrera_historia_pareto.html
- Facultad de Química. (09 de Mayo de 2012). *Analisis de Superficies* . Recuperado el 29 de Mayo de 2016 , de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/ANALISISDESUPERFICIES_19579.pdf
- Facultad de Química. (23 de Septiembre de 2015). *Amyd*. Recuperado el 27 de Abril de 2016, de Preparaciones Microbiologicas : http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U2j_PreparacionesMicrobiologicas_17194.PDF
- Facultad de Química,UNAM. (06 de Febrero de 2013). *Introducción a la Microbiología*. Recuperado el 13 de Abril de 2016, de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U1_IntroduccionMicrobiologia_18981.pdf
- Facultad de Química. (11 de Febrero de 2015). *Microorganismos indicadores*. Recuperado el 19 de Junio de 2016, de UNAM : http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/2Indicadores_6422.pdf
- Facultad de Química. (21 de Junio de 2007). *Microorganismos de alteración o deterioro* . Recuperado el 29 de Junio de 2016 , de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/4Alteracion_6541.pdf
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016). *Qué hacemos* . Recuperado el 18 de Abril de 2016, de <http://www.fao.org/about/what-we-do/es/>

- Food and Drug Administration. (18 de Abril de 2016). *FDA U.S. Food and Drug Administration* . Recuperado el 19 de Abril de 2016 , de <http://www.fda.gov/AboutFDA/Transparency/Basics/EnEspanol/ucm196524.html>
- Food and Drug Administration. (30 de Abril de 2012). *Is It a Cosmetic, a Drug, or Both? (Or Is It Soap?)*. Recuperado el 30 de Mayo de 2016, de <http://www.fda.gov/cosmetics/guidanceregulation/lawsregulations/ucm074201.htm>
- Garcés, A. (2009). *Deterioro Microbiano*. Venezuela: Facultad de Farmacia - Universidad central de Venezuela .
- García, E. L. (2004). *Manual de seguridad en laboratorios de Microbiología Molecular* . Mexico : UNAM .
- García, V. (2004). *Introducción a la Microbiología* . Costa Rica : Editorial Universidad Estatal a Distancia .
- Gimeno, A. (04 de Mayo de 2002). *Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas*. Recuperado el 03 de Julio de 2016 , de Micotoxinas : <https://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/principales-factores-condicionantes-desarrollo-t342/p0.htm>
- Gómez Toscano, V., Hernández Orozco , H., González Sardaña , N., Casteñeda Narváez, J., & Rosas Ruíz, A. (2013). Bacteriemia por B. cepacia. ¿Un signo de alarma para la presencia de un brote? *Acta pediátrica de México* , 16-20.
- González Pellicer, A. (04 de Julio de 2013). *Bidi UNAM* . Recuperado el 27 de Abril de 2016 , de Universidad Politecnica de Valencia : <http://hdl.handle.net/10251/30603>
- Gutiérrez de Gamboa , S., & Rossi Devivo , L. (2001). *LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AMBIENTE, SUPERFICIES*. Venezuela : Facultad de Farmacia .
- Hernandez Landa, J. (01 de Enero de 2015). *Linea del tiempo historia de la calidad* . Recuperado el 12 de Abril de 2016, de http://es.slideshare.net/josevazquezlanda/linea-del-tiempo-historia-de-la-calidad?next_slideshow=1
- Hernández, A. (20 de Mayo de 2014). *México se maquilla, es el décimo lugar en industria de la belleza* . Recuperado el 04 de Junio de 2016 , de El financiero : <http://www.elfinanciero.com.mx/economia/mexico-se-maquilla-es-decimo-lugar-en-industria-de-la-belleza.html>
- Instituto de Salud Pública de Chile (2010). *GUÍA DE INSPECCIÓN DE BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA (GMP) PARA LA INDUSTRIA DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS* . Chile : Gobierno de Chile.
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo de España. (23 de Septiembre de 2012). *Candida albicans*. Recuperado el 02 de Julio de 2016, de BDATABiO: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Hongos/Candida%20albicans.pdf>

- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo de España. (16 de Julio de 2014). *Cladosporium spp.* Recuperado el 03 de Julio de 2016 , de BDATABio: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Hongos/Cladosporium%20spp.pdf>
- International Commission on Microbiological Specification for foods. (2006). *GUIA SIMPLIFICADA PARA EL ENTENDIMIENTO Y USO DE OBJETIVOS.*
- Instituto Nacional de Tecnología Industrial. (1 de Marzo de 2015). *Pruebas de desempeño de productos.* Recuperado el 13 de Octubre de 2016, de http://www.inti.gov.ar/productos/pdf/mat_cont_microbiologico.pdf
- ISO9001. (2011). *Herramientas de Sistemas de Calidad.* Recuperado el 12 de Marzo de 2017, de Requisitos de documentación: <http://www.normas9000.com/iso-9000-13.html>
- ISO9000:2005. (10 de Noviembre de 2014). *Documentacion de Sistema de Gestión de calidad .* Recuperado el 12 de Marzo de 2017 , de <http://www.nueva-iso-9001-2015.com/2014/11/iso-9001-documentacion/>
- ISO9000:2005. (2005). *Norma Internacional ISO 9000: 2005 Traducción certificada.* Ginebra, Suiza: Propiedad de ATR.
- Junipero, A. (20 de Julio de 2015). *COSMETICOS BUENAS PRACTICAS DE PRODUCCION COSMETICA LEGISLACION COSMETICA VIGENTE.* Recuperado el 01 de Junio de 2016 , de SlidePlayer : <http://slideplayer.es/slide/141818/>
- Ledermann, W. (2007). *Una historia personal de las bacterias .* Chile : Ril Editores .
- Ledermann, W. (2007). *Una historia personal de las bacterias .* Chile : Ril editres .
- Lemmel, J. (2008). *Conservantes, tipos y sistemas de conservación .* *Ámbito Farmacéutico* , 58-64.
- Leranoz, S. (01 de Julio de 2002). *Dermofarmacia, Conservantes Cosméticos.* Recuperado el 12 de Junio de 2016, de DOYMAFARMA: http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pidet_articulo=13034831&pidet_usuario=0&pidet_revista=4&fichero=4v21n07a13034831pdf001.pdf&ty=14&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es
- Ley General de Salud. *ART 269, Productos de perfumeria y belleza.* Recuperado el 30 de Octubre de 2016, de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/legis/lgs/index-t12.htm>
- López-Jácome, L. E., Hernández Durán, M., Colín Castro, C. A., Ortega Peña, S., Cerón González, G., & Franco Cendejas, R. (2014). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en Discapacidad* , 10-18 .

- Mangenello , S., Tayara, A., Perazzi , B., Neira , L., Famiglietti , A., Pugliese , L., y otros. (2001). Caracterización y distribución de especies de *Citrobacter* en un hospital universitario . *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica* .
- Martin , A. (2012). *Candida albicans*, un hongo oportunista. *El herbolario*.
- Méndez Tovar , L. (19 de Octubre de 2015). *Aspergilosis* . Recuperado el 03 de Julio de 2016, de Departamento de Microbiología y Parasitología : <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/aspergilosis.html>
- Merk. (2016). *Readycult® Coliformes 100*. Recuperado el 30 de Julio de 2016, de https://system.netsuite.com/core/media/media.nl?id=4121&c=3339985&h=4aa4c1f8efa39ed4ed8c&_xt=.pdf
- Mesa, C. (04 de Septiembre de 2014). *Bacterias en maquillaje* . Recuperado el 26 de Junio de 2016 , de Prezi : <https://prezi.com/zzuid5ycj0va/bacterias-en-el-maquillaje/>
- Miranda , C., & Rojo , M. (2015). *Clostridium perfringens: INFECCIONES DE PIEL Y TEJIDOS BLANDOS*. México: Control Calidad SEIMC .
- Miranda Gonzalez , F., Chamorro Mera, A., & Rubio Lacoba , S. (2007). *Introducción a la gestión de la calidad*. Madrid : Delta, Publicaciones universitarias .
- Montoya Villafañe , H. H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines* . Colombia : Universidad de Antioquia .
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2006). *Microbiología Médica* . España : Elsevier.
- Navarra, U. P. (2004). *Microbiología clínica* . Recuperado el 25 de Junio de 2016 , de Genmic: <http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema03.pdf>
- Navarro, J. M., Prieto, J., & De la Rosa, M. (2011). *Microbiología en ciencias de la salud. Conceptos y aplicaciones*. Barcelona, España: Elsevier.
- Negrón, M. (2009). *Microbiología Estomatológica*. Argentina: Editorial Medica Panamericana.
- NMX-AA-42-1987, N. M. (03 de Junio de 1987). *CALIDAD DEL AGUA DETERMINACION DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP) DE COLIFORMES TOTALES, COLIFORMES FECALES (TERMOTOLERANTES) Y Escherichia coli PRESUNTIVA*. Recuperado el 23 de Octubre de 2016, de http://lasa.ciga.unam.mx/monitoreo/images/biblioteca/44%20NMX-AA-042-1987_Coliformes_fecales.pdf
- Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y Delito (2010). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. New York : Naciones Unidas .
- Organización Mundial de la Salud.(2016). *Acerca de la OMS* . Recuperado el 18 de Abril de 2016, de <http://www.who.int/about/what-we-do/es/>

- Organización Mundial de la Salud. (2005). *Manual de Mantenimiento para equipo de laboratorio* . Washington D.C : Organización Mundial de la Salud .
- Paster , B., Falkler , W., Enwonwu, C., Idigbe , E., Savage , K., & Levanos , V. (2002). *Prevalent bacterial species and novel phylotypes in advanced noma lesions*. EUA: J Clin Microbiol.
- Petrifilm™,3M™. (2000). *Guía de interpretación* . Recuperado el 07 de Agosto de 2016, de Placas petrifilm para Levaduras y Mohos : http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf
- Petrifilm™,3M™. (2001). *Guía de Interpretación*. Recuperado el 07 de Agosto de 2016, de Placas para recuento de coliformes totales: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf
- Petrifilm™,3M™. (2013). *Guía de Interpretación* . Recuperado el 07 de Agosto de 2016, de Recuento de Mohos y levaduras Express : <http://www.kitsrapidos.com/media/64bc670e4c04eeacfff82caffffd523.pdf>
- Petrifilm™,3M™. (2015). *Guía de Interpretación*. Recuperado el 07 de Agosto de 2016, de Recuento rápido de Mesófilos aerobios Express: <http://www.kitsrapidos.com/media/64bc670e4c04eeacfff82cbffffd523.pdf>
- Petrifilm™,3M™. (2009). *Guía de Interpretación*. Recuperado el 07 de Agosto de 2016, de Placas para recuento de Mesófilos aerobios: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf
- Pizabarro , A. G. (2008). *Microbiología General* . Pamplona : Universidad Pública de Navarra .
- PROY-NOM-259-SSA1-2014, P. d. (15 de Diciembre de 2014). *Diario oficial de la federación* . Recuperado el 30 de Octubre de 2016 , de http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5378954&fecha=20/01/2015
- Puerta García, A., & Mateos Rodríguez, F. (2010). *Enterobacterias* . México : Facultad de Medicina UNAM.
- QUALITY, A. (2002). *Enciclopedia de la Calidad* . Madrid : FC Editorial .
- Quality-systems. (11 de junio de 2013). *Pensadores de la calidad* . Recuperado el 12 de Abril de 2016 , de <http://sistemas-de-calidad-paco.blogspot.mx/2013/06/pensadores-de-la-calidad-walter.html>
- Quality & Performance Management Software. (20 de Junio de 2013). *ISOTOOLS* . Recuperado el 18 de Abril de 2015, de <https://www.isotools.org/2013/06/20/iso-organizacion-internacional-de-normalizacion-historia-funciones-y-estructura/>

- Quistian, H. (29 de Octubre de 2014). *Microbiología*. Recuperado el 28 de Abril de 2016 , de <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.mx/2014/10/metodos-y-tecnicas-de-tincion.html>
- Ramírez Trejo , V. (2009). *Elaboración de procedimientos normalizados de operación requeridos para el control microbiológico de medicamentos estériles*. México: tesis de licenciatura Q.F.B UNAM.
- Raúl, R. C. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana* . México : Editorial Medica Panamericana .
- Ríos, A., & Valcárcel , M. (1992). *La calidad en los laboratorios analíticos* . España : Reverté, S.A .
- Rivera Mejia , C. M., & Sagastizado Mendez , J. A. (2014). *DETERMINACION DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE COLADOS PARA BEBES COMERCIALIZADOS EN SUPERMERCADOS UBICADOS EN EL DISTRITO 2 DE LA ZONA 2 DEL AREA DE SAN SALVADOR*. San Salvador : Universidad de el Salvador .
- Saavedra Lozano , J., Santos Sebastián , M., Hernández Sampelayo , T., González , F., & Navarro Gómez, M. (2008). *Infecciones Bacterianas de la piel y tejidos blandos* . Madrid : Hospital General Universitario Gregorio Marañón .
- Salas Tellez, E., Nuñez del arco, A., Flores Vallejo , A., & Amaya Leon , G. (2011). *Manual de laboratorio de Micología Médica* . México : Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán .
- Secretaría de Economía de México (2009). *Industria Cosmética* . Recuperado el 30 de Marzo de 2016 , de <http://www.2006-2012.economia.gob.mx/economia-para-todos/abc-de-economia/mercado-interno/356-industria-cosmetica>
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (01 de Diciembre de 2013). *Que es la SEMARNAT* . Recuperado el 18 de Abril de 2016 , de <http://www.semarnat.gob.mx/conocenos/quienessomos>
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2007). *Guía de cumplimiento de la Norma oficial mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002*. México: Secretaría de salud.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (17 de Febrero de 2003). *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, PROTECCION AMBIENTAL-SALUD AMBIENTAL-RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS- CLASIFICACION*. Recuperado el 08 de Agosto de 2016, de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>
- Secretaría de Salud. (1994). *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-112-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE*. México : Diario oficial de la federación .
- Secretaría de Salud. (25 de Septiembre de 1995). *Norma Oficial Mexicana NOM-089-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza*. Recuperado el 02 de Agosto de 2016, de Diario Oficial de la Federación: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/089ssa14.html>

Secretaría de Salud. (12 de Diciembre de 1995). *NORMA Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias*. Recuperado el 02 de Agosto de 2016, de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>

Secretaría de Salud. (04 de Octubre de 1995). *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-093-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PRACTICAS DE HIGIENE Y SANIDAD EN LA PREPARACION DE ALIMENTOS QUE SE OFRECEN EN ESTABLECIMIENTOS FIJOS*. Recuperado el 01 de Marzo de 2017, de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/093ssa14.html>

Secretaría de Salud. (10 de Mayo de 1995). *Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa*. Recuperado el 04 de Agosto de 2016 , de Diario Ofical de la Federación : <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html>

Secretaría de Salud. (18 de Julio de 1997). *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-141-SSA1-1995, BIENES Y SERVICIOS. ETIQUETADO PARA PRODUCTOS DE PERFUMERIA Y BELLEZA PREENVASADOS*. Recuperado el 18 de Marzo de 2017 , de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/141ssa15.html>

Secretaría de Salud. (16 de Octubre de 2015). *COFEPRIS* . Recuperado el 18 de Abril de 2016, de *ATRIBUCIONES, FUNCIONES Y CARACTERÍSTICAS DE LA COFEPRIS*: <http://www.cofepris.gob.mx/cofepris/Paginas/AtribucionesFuncionesYCaracteristicas.aspx>

Secretaría de Salud. (2012). *Manual de Organización General de la Secretaría de Salud* . México : Diario oficial .

Secretaría de Salud. (24 de septiembre de 2001). *NORMA Oficial Mexicana NOM-179-SSA1-1998, Vigilancia y evaluación del control de calidad del agua para uso y consumo humano, distribuida por sistemas de abastecimiento público*. Recuperado el 27 de noviembre de 2016 , de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/179ssa18.html>

Secretaría de Salud. (12 de julio de 2005). *NORMA Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muest*. Recuperado el 27 de noviembre de 2016, de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/230ssa102.html>

Soledad Rodríguez, B. E. (2009). *La validación en la industria* . Caracas : Lulu.com .

Summers, D. (2006). *Administración de la calidad* . Mexico : Pearson, educación de México .

Todar, K. (2012). *Online textbook of bacteriology* . Recuperado el 29 de Abril de 2016, de http://textbookofbacteriology.net/Bacillus_3.html

Torres, M. (2012). *LA AOAC Internacional* . Chile : Departamento de desarrollo y Metodos .

- Torrice Helguero, E. (2012). *Bacilos Gram negativos no fermentadores: Pseudomonas, Stenotrophomonas, Acinetobacter, Burkholderia*. México: Vigilancia, prevención y control de infecciones asociadas a servicios de salud.
- Universidad Autónoma Metropolitana. (24 de Julio de 2015). *Manual de laboratorio- Microbiología aplicada* . Recuperado el 24 de Julio de 2016 , de UAM Azcoptzalco : <http://www.azc.uam.mx/cbi/quimica/microbiologia/p17.pdf>
- Universidad Autónoma Metropolitana. (2004). *Preparación de colorantes*. Recuperado el 11 de Marzo de 2017, de Microbiología aplicada: http://www.azc.uam.mx/cbi/quimica/microbiologia/ap_b.pdf
- Universidad de Sevilla. (10 de Septiembre de 2014). *Prácticas de Microbiología. Tinción de Gram. Vídeo 1*. Recuperado el 14 de Agosto de 2016 , de Youtube : <https://www.youtube.com/watch?v=FceD8FFhew>
- Urzua, C. (11 de Agosto de 2013). *Endospora* . Recuperado el 2016 de Abril de 29, de Facultad de Química UNAM : <https://www.youtube.com/watch?v=3bk5zEV9AvA>
- Urzua, C. (23 de Enero de 2014). *Técnica aséptica*. Recuperado el 01 de Mayo de 2016, de Facultad de Química: <http://mediacampus.cuaed.unam.mx/node/4209>
- Wilhelm, M. (2013). *Métodos estándar para el examen del Agua y Aguas residuales* . Guatemala : Digitally signed.

ANEXO A. TABLAS PARA LA DETERMINACION DE NÚMERO MÁS PROBABLE

Índice de NMP donde son utilizados 5 tubos con proporciones de 10, 1 y 0.1 ml (NMX-AA-42-1987, 1987)

No. De tubos con reacciones positivas.			Índice del NMP/ 100 ml	Límite de confianza 95%.		No. De tubos con reacciones positivas.			Índice del NMP/ 100 ml	Límite confianza 95%.	
5tubos con 10 ml	5 tubos con 1 ml	5tubos con 0.1 ml		Inferior	Superior	5 tubos con 10 cm ³ .	5 tubos con 1 cm ³ .	5 tubos con 0.1 cm ³ .		Inferior	Superior
0	0	0	< 2								
0	0	1	2	< 0.5	7	4	2	1	26	9	78
0	1	0	2	< 0.5	7	4	3	0	27	9	80
0	2	0	4	< 0.5	11	4	3	1	33	11	93
						4	4	0	34	12	93
1	0	0	2	< 0.5	7						
1	0	1	4	< 0.5	11	5	0	0	23	7	70
1	1	0	4	< 0.5	11	5	0	1	31	11	89
1	1	1	6	< 0.5	15	5	0	2	43	15	110
1	2	0	6	< 0.5	15	5	1	0	33	11	93
						5	1	1	46	16	120
2	0	0	5	< 0.5	13	5	1	2	63	21	150
2	0	1	7	1	17						
2	1	0	7	1	17	5	2	0	49	17	130
2	1	1	9	2	21	5	2	1	70	23	170
2	2	0	9	2	21	5	2	2	94	28	220
2	3	0	12	3	28	5	3	0	79	25	190
						5	3	1	110	31	250
3	0	0	8	1	19	5	3	2	140	37	340
3	0	1	11	2	25						
3	1	0	11	2	25	5	3	3	180	44	500
3	1	1	14	4	34	5	4	0	130	35	300
3	2	0	14	4	34	5	4	1	170	43	490
3	2	1	17	5	46	5	4	2	220	57	700
3	3	0	17	5	46	5	4	3	280	90	850
						5	4	4	350	120	1000
4	0	0	13	3	31	5	5	0	240	68	750
4	0	1	17	5	46	5	5	1	350	120	1000
4	1	0	17	5	46	5	5	2	540	180	1400
4	1	1	21	7	63	5	5	3	920	300	3200
4	1	2	26	9	78	5	5	4	1600	640	5800
4	2	0	22	7	67	5	5	5	≥2400		

Índice de NMP donde son utilizados 3 tubos con proporciones de 10, 1 y 0.1 ml (NMX-AA-42-1987, 1987)

No. de tubos con reacciones positivas.			Índice del NMP/ 100 ml	Límite de confianza del 95%	
3 tubos con 10 ml	3 tubos con 1 ml	3 tubos con 0.1 ml		Inferior	Superior
0	0	0	< 3		
0	0	1	3	< 0.5	9
0	1	0	3	< 0.5	13
1	0	0	4	< 0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800
3	3	3	≥ 2400		