

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA, UNAN-LEON.

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Farmacia.



"Estudio microbiológico en pinturas labiales en barra, comercializadas en las canastas del Mercado La Terminal en el periodo comprendido de Febrero - Noviembre del 2018."

Monografía para optar al Título de Licenciado Químico- Farmacéutico.

AUTORES:

- Br. Denisse Mercedes Alvarado Altamirano.
- Br. María Gabriela Gutiérrez.

TUTORA:

- ✓ M.Sc. Gloria Herrera.

León, Nicaragua. Diciembre 2018

¡A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD!



Agradecimiento

Primeramente, a dios por regalarnos la vida, brindarnos fe y sabiduría para poder culminar nuestros estudios profesionales.

A cada uno de nuestros padres que con muchos esfuerzos se convierten en nuestros ejemplos a seguir, en donde nos impulsan a no darnos por vencidos y lograr cada meta en nuestra vida tanto como personas y profesionales.

A cada uno de nuestros maestros que nos transmitieron sus distintos conocimientos en el transcurso de nuestras vidas.

A nuestra tutora Msc. Gloria Herrera, quien fue un pilar fundamental para la elaboración de nuestro trabajo monográfico, en donde nos brindó confianza y sobre todo nos ayudó a formarnos como profesionales farmacéuticos.

Al departamento de farmacia industrial de la facultad de ciencias químicas de la UNAN.LEON por permitirnos desarrollar este estudio experimental en el laboratorio de control microbiológico.

Y a cada una de las personas que día a día nos motivaron a seguir en nuestros estudios.

Denisse y Gabriela.



Dedicatoria

De manera muy especial les doy mi más sincera dedicatoria a las siguientes personas:

Primeramente, a Dios todo poderoso por darme mucha fe y fortaleza para ser capaz de lograr mi mayor objetivo y darle las gracias por que sin él no seriamos nada.

A mis padres Rigoberto Alvarado y Sandra Altamirano por brindarme su amor incondicional, sus mejores consejos y porque siempre lucharon para sacarme adelante y poderme formar académicamente.

A mi abuelito, Denis Altamirano por ser un pilar fundamental en mi vida, en el cual me ha apoyado en todo momento para que hoy pueda terminar mi carrera.

A mis maestros que con mucha dedicación me transmitieron sus conocimientos en especial a nuestra tutora Ms. Gloria Herrera quien nos ha guiado para realizar nuestra monografía.

Br. Denisse Mercedes Alvarado Altamirano.



Dedicatoria

A Dios,

Por Haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi Madre Danelia y a mi abuela Concepción.

Por Haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi Hijo Ramiro Alexander.

Por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor.

A mis Amigos.

Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos.

Finalmente, a los maestros, aquellos que marcaron cada etapa de nuestro camino universitario y que me ayudaron en asesoría y dudas presentadas en la elaboración de la tesis.

Br. María Gabriela Gutiérrez



INDICE.

Introducción..... Pág.1

Planteamiento del problema.....Pág. 4

Objetivos..... Pág.5

Marco teórico..... Pag.6

Diseño Metodológico..... pág. 53

Resultados y Análisis de Resultados..... pág. 64

Conclusión..... pág. 69

Recomendación..... pág. 70

Bibliografía..... pág. 71

Anexos..... pág. 76



Introducción.

Los cosméticos es un término general que se aplica a todas las preparaciones y elementos de uso externo para acondicionar y embellecer el cuerpo, limpiando, coloreando, suavizando o protegiendo la piel, el pelo, las uñas, los labios o los ojos. (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

La fisiología de los labios es diferente a la del resto de la piel y por ello su cuidado requiere de cosméticos específicos como los protectores labiales. Pero la industria dermofarmacéutica no sólo nos ofrece formulaciones y presentaciones diversas de estos productos que conviene conocer bien, sino también nuevas opciones en cosmética labial decorativa. (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

Están excluido como cosméticos aquellos preparados destinados a la prevención, diagnósticos, y tratamientos de enfermedades, así como los destinados a ser ingeridos, inhalados, inyectados o implantados en el cuerpo humano; estos productos no podrán proclamar actividad terapéutica alguna. Tampoco se consideran cosméticos aquellos preparados destinados a la protección frente a la contaminación o infección por microorganismo, hongos y parásitos. (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

El empleo casi universal de los cosméticos en el tiempo modernos ha crecido con el estudio científico de los ingredientes empleados; su uso está extendido entre las mujeres en mayor proporción, sobre todo en los países occidentales. La industria cosmética actual esta denominada por una serie multinacionales que surgieron partir del siglo XX.



En este estudio realizado sobre “Evaluación de la calidad microbiológica de cosméticos para bebés elaborado por la industria guatemalteca” llevado a cabo por la Lic. Ligia Maria Guerra Bone, en Octubre 2003, en la Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de ciencias químicas y farmacia. Se determinaron los siguientes resultados; Todos los productos cosméticos analizados se encuentran libres de agentes bacterianos patógenos y cumplen con los parámetros de calidad microbiológica especificados por el Laboratorio Nacional de Salud. La única muestra que presentó crecimiento bacteriano fue sometida a un análisis posterior con el objetivo de identificar a la bacteria presente y para descartar que se tratase de ***Bacillus anthracis*** o ***Bacillus cereus***, los cuales pueden ocasionar daños a la piel del consumidor, sobre todo tratándose de bebés cuya piel es mucho más sensible; sin embargo los resultados de las pruebas realizadas no son compatibles con ninguna de las dos especies mencionadas (Bone. L.M. 2003)

En el siguiente estudio los estudiantes de la Universidad Nacional De Trujillo, de la carrera de farmacia, Br. Cruz. F. Melissa I., Br. Gracia. CH. Carol. P. Realizaron una investigación sobre “Calidad de rubores cosméticos comercializados en emporio albarracin trujillo - 2016” para optar el título en farmacia y bioquímica, Trujillo-Perú 2017. Los rubores cosméticos de las marcas Belle Spa, Blush-On Raquel, Blush M.M, Blush M.M 01, Scarlet, Scarlet 01, Baolishi 01, Thais Garden, RW comercializados en Albarracin del distrito de Trujillo, en la determinación de característica organoléptica como presentación, olor, aspecto y adherencia, no presentaron resultados aceptables. En el control microbiológico de aerobios mesofilos totales en los rubores estudiados, se obtuvo un 5% de la marca BELLE SPA y un 95% de ausencia en las otras marcas; en la determinación de Enterobacterias (***E.coli***), se obtuvo un 5% de las marcas BELLE SPA, BLUSH M-M, BAOLISHI, THAIS GARDEN Y RW y un 95% presentan ausencia en las marcas SCARLET, SCARLET 01, BLUSH M-M 01 y BAOLISHI; y en la identificación de ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Staphylococcus aureus***, todas las muestras reportaron ausencia. Los rubores cosméticos comercializados en emporio Albarracin, Trujillo; que pertenecen a un mercados



ambulatorio informal; en base a los resultados obtenidos, el 100% de los productos son de mala calidad, considerando no aptos para el consumo humano, representando un riesgo para la salud del público consumidor (Cruz.M.F. Carol.G.CH. 2017)

El profesional químico farmacéutico es un ente fundamental en todo proceso de elaboración y control de los productos cosméticos. La inocuidad y la calidad de los productos cosméticos constituyen elementos importantes para la salud de la población y es necesario verificar que el producto sea seguro desde el punto de vista organoléptico, fisicoquímico y microbiológico para garantizar la seguridad y bienestar de las personas que lo utilizan, por ello creemos conveniente analizar la calidad de los cosméticos labiales comercializados en el mercado La Terminal, León, contribuyendo de esta manera a prevenir y mejorar la calidad de vida de la población usuario.



Planteamiento del Problema.

La industria cosmética, es uno de los campos, donde el químico farmacéutico puede ejercer su profesión, esta área se encarga del desarrollo. Elaboración, producción y control de calidad de productos cosméticos; que es un término general que se aplica a todas las preparaciones y/o elementos constituidos por sustancias naturales, sintéticas o sus mezclas, de uso externo en diversas partes del cuerpo humano: piel, sistema capilar, uñas, labios, órganos genitales externos. Dientes y membranas mucosas de la cavidad oral, con el objeto exclusivo o principal de higienizarlas, perfumarlas, cambiar su apariencia, protegerla, mantenerlas en unos buenos estados y/o corregir olores corporales (Diaz.J.P.2018).

Cuando se elaboran un producto es recomendable hacer pruebas de estabilidad en las siguientes tres etapas del ciclo de vida de un producto: diseño y desarrollo, antes de ponerlo en el mercado y durante la comercialización del mismo. Esto con el fin de garantizar la calidad del producto cosmético que está a disposición del consumidor, ante esta situación se plantea la siguiente interrogante (Diaz.J.P.2018).

¿Las pinturas labiales comercializadas de forma ambulante en el mercado la terminal de León cumplen con los controles microbiológicos y rangos establecidos por el RTCA 71.03.45:07 para este tipo de producto?



OBJETIVOS.

OBJETIVOS GENERAL

- ❖ Evaluar calidad microbiológica de labiales de uso cosmético por medio del ensayo de límite microbiano, comercializados en el mercado terminal según RTCA 71.03.45:07

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analizar el recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas en las muestras en estudio.
- Determinar la presencia de microorganismos objetables en las muestras en estudio.
- Determinar la presencia de hongos levaduras en las muestras analizadas



MARCO TEORICO



Cosméticos

Son sustancias que se elaboran para que interactúen con distintas zonas externas del cuerpo, para su limpieza o embellecimiento, con un especial énfasis en el rostro (en el caso del maquillaje). Los cosméticos, nunca pueden ser ingeridos. Ya que su actuar, versa de manera exclusiva, con la piel, las uñas, los dientes, etc. Todas aquellas zonas que se ven expuestas al medioambiente (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

Los cosméticos y el maquillaje, se han ganado un puesto muy relevante, entre los productos consumidos por los seres humanos. En especial, dentro del segmento de las mujeres. Y es que son ellas, quienes más los consumen. Ya que, de manera natural, ellas se preocupan de su apariencia física. Pero hoy en día, los hombres se han ido introduciendo cada vez más en este mundo. Y es que ellos también se han percatado, que su apariencia externa, es la principal carta de presentación, hacia el resto del mundo (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

Los cosméticos, fueron utilizados hace más de 5000 años atrás, por los egipcios. En aquella época, los cosméticos no eran privativos de las mujeres. Tanto los hombres como las mujeres los empleaban. Por ejemplo, los faraones, monarcas de Egipto, eran asiduos al uso de maquillaje, para resaltar sus rasgos reales. Incluso, eran utilizados como una manera de preservar la cantidad de las doncellas egipcias. Ya que se les colocaba por todo el cuerpo; de esa manera, si era tocada por otro hombre, su marido se enteraría de inmediato (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

El “Mesdemet” fue la más vieja clase de sombra para ojos. Una sustancia hecha de cobre y mena de plomo. Creían que las sombras oscuras ahuyentarían a los males de ojo. Era también un gran desinfectante y repelente de insectos. El “Kohl” era un polvo oscuro que también era aplicado alrededor de los ojos en una forma oval. Era una combinación de plomo, ceiza, ocre, cobre, y almendras quemadas. Para realzar la apariencia, se aplicaban



una mezcla de agua y bol arménico en el área del pómulo. También se pintaban sus uñas de color naranja y amarillo con una sustancia llamada alheña (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

Así mismo, los griegos y los romanos, también utilizaron cosméticos. Nuevamente, los cosméticos eran utilizados tanto por hombres, como por mujeres. Lo mismo ocurrió en la cultura persa. La cual, al igual que los egipcios, utilizaba los cosméticos, para resaltar sus rasgos faciales. En la cultura japonesa, los cosméticos, eran utilizados por las famosas geishas. Aquellas mujeres que eran entrenadas para satisfacer por completo, a los varones. Ellas utilizaban una gran capa de maquillaje en su cara. La cual era pintada de manera muy prolija, principalmente con un color blanco, para provocar un aspecto intrigante y sensual, frente al varón (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

Pero los cosméticos, no siempre han sido del agrado de todas las personas. A comienzos del siglo XIX, fueron prohibidos en el Reino Unido, por su majestad la Reina Victoria. Ya que ella los consideró vulgares, por el hecho que eran utilizados por actores y las prostitutas londinenses. De esa manera, nadie en el reino, pudo por varios años, utilizar cosméticos (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

Por tal motivo es que estos productos, o son odiados o son amados. Pero en la actualidad, los cosméticos son una marca indeleble, de belleza y juventud. Y esto se debe, ya que, a comienzos del siglo XX, los cosméticos comenzaron a ser producidos realmente en masa. Con lo cual, la oferta aumentó y la demanda creció, de manera natural, principalmente al término de la Segunda Guerra Mundial, durante la cual, existieron diversas limitaciones a variados productos (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

Al finalizar la guerra, muchas personas comenzaron a consumirlos sobre todo en los Estados Unidos. Es así, como diversas compañías, asentarían sus bases, para el incremento desbordado de los cosméticos. Entre esas compañías se encuentran Rubinstein, Max Factor, Revlon y Estée Laude (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)



LABIALES

Es una barra pequeña hecha de una sustancia compacta y grasa que se usa como cosmético para dar color a los labios, y que generalmente va guardada en un pequeño estuche alargado (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

También es conocido como pintalabios, lápiz de labio o colorete, este producto cosmético que contiene pigmentos, aceites, ceras y emolientes que dan color y textura a los labios (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

Clasificación de pinturas labiales.

✓ Pomadas de labios:

La pomada de labios se utiliza no para decorar, si no para proteger frente a exposiciones al frío, en invierno o condiciones árticas. El requerimiento es simplemente de una película en los labios bastante sustancial, flexible, adherente, resistente a la humedad, no hay necesidad de colorantes y, por lo tanto de ninguna sustancia disolvente del color. La base se puede fabricar en gran parte de aceites, geles y ceras minerales, pero es necesario incluir una proporción de una sustancia hidrófila para favorecer la adherencia, mezcla de perfume propiedades generales. En algunos casos se puede añadir una pequeña cantidad de antiséptico y, a veces, algunos usuarios prefieren una pomada coloreada en cuyo caso se proporciona el color mediante una pequeña cantidad de colorante liposolubles o laca dispersada no necesariamente un tipo de colorante (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

✓ Labial líquidos:

Las barras de labios líquidas se han desarrollado con el objeto de proporcionar películas más permanentes que las que se pueden obtener con barras de labios convencionales. Estas barras de labios líquidas constan de soluciones alcohólicas de colorantes solubles en



alcohol, resinas formadoras de películas adecuadas y plastificante. El disolvente empleado es el alcohol etílico; las formadoras de la película incluyen etil celulosa, alcoholes poli vinílicos, y acetato de polivinilo y, como plastificante, se han utilizado citrato de trietilo, acetato de dioctilo, abietato de metilo o polietilen glicoles. Los colorantes empleados son fluoresceínas halogenadas solubles en alcohol y también otros colorantes solubles en el mismo.

La fabricación de barras de labios líquidas basada en etil celulosa se cubre por una patente (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

✓ **Lápiz de labio:**

También conocido como delineador. Permite definir o redibujar la forma de los labios haciendo que el acabado sea mucho más bonito y ajustándose a las necesidades de cada mujer (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

✓ **Barra de labios en lápiz:**

A medio camino entre el delineador y la barra. Tiene mucha aceptación por que permite pintar el labio con mucha precisión pero con una textura más cremosa (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

✓ **Gloss o brillo de labios:**

Pueden encontrarse en varios formatos, todos igual de cómodos y prácticos (hay que tener en cuenta que requiere de constante retoques). Bien pueden ser pequeñas botellas cilíndricas con un aplicador redondeado en la punta, con una punta en forma de pequeño pincel o con un aplicador del que sale el producto al hacer una ligera presión. (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)



✓ **En crema:**

Bien puede encontrarse en paletas de varios tonos que se aplica con brocha especial para labios o en botes similares a los de las cremas faciales pero de un tamaño más pequeño (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

✓ **Pintalabios mate:**

Suelen aportar un aspecto más sobrio pero cada vez son más populares también para los eventos de noche. La gama va desde el nude al negro. El mayor peligro que tiene es que si bien pintan mucho y duran bastante los labios tienden a ir perdiendo hidratación. (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

✓ **Pintalabios semi-mate:**

Puede ser el tipo más novedoso y casi todas las firmas y maquillaje y cosmética están sacando nuevos labiales que prometen hidratación sin renunciar a una larga duración (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

✓ **Pintalabios cremosos:**

La opción más clásica y una de las más demandadas por su amplia variedad de colores y la suavidad que aporta a los labios. (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

✓ **Pintalabios ultra brillantes:**

Los más atrevidos e ideales para dar a la sonrisa volumen y una gran luminosidad. Perfectos para las mujeres de labios más finos. El mayor problema es la corta duración y que exige un retoque constante para que el acabado sea el deseado. (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)



✓ **Bálsamo y tratamientos extra-volumen:**

Los hay en protección solar o simplemente hidratantes, como el cacao o las vaselinas. (Wilkinso.J.B. Moore.R.J 1990)

Control de calidad:

El control de calidad consiste en realizar mediciones de parámetro del producto, determinando si los valores obtenidos están en concordancia con unas especificaciones preestablecidas. Generalmente, dicho control de calidad es aplicado a los productos producidos y utilizados por una empresa ya se trate de productos finales, intermediarios o materias primas (castellano PM. 2010).

Control de calidad microbiológico

La contaminación microbiana de los productos farmacéuticos y cosméticos ha sido extensamente estudiada tanto a nivel nacional como internacional.

Los productos para administración parenteral y de uso ocular deben ser estéril existen otras formas farmacéuticas que se usas por vía oral, tópica, nasal, vaginal, etc., fabricadas con ingredientes que pueden ser substratos adecuados para los microorganismos. Las preparaciones farmacéuticas y los cosméticos pueden contaminarse con hongos filamentosos, levaduras y bacterias. La materia prima naturales, el equipamiento, el agua, los operadores, el aire, y el material de empaque pueden ser fuentes de contaminación de los productos farmacéuticos y cosméticos (Bombliies, Weib and Beckman.2007).

La U.S Food and Drug Administration (FDA) reconoce tres categorías de microorganismo:

- Patógenos,
- oportunistas
- objetables (Cerra. H. Fernández M. C. et al. 2010).



Patógenos son aquellos microorganismos o toxinas responsables de enfermar o infectar al hombre (*Salmonella sp, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Clostridium spp*, etc.) (Cerra,H. Fernandez M.C. et al. 2010).

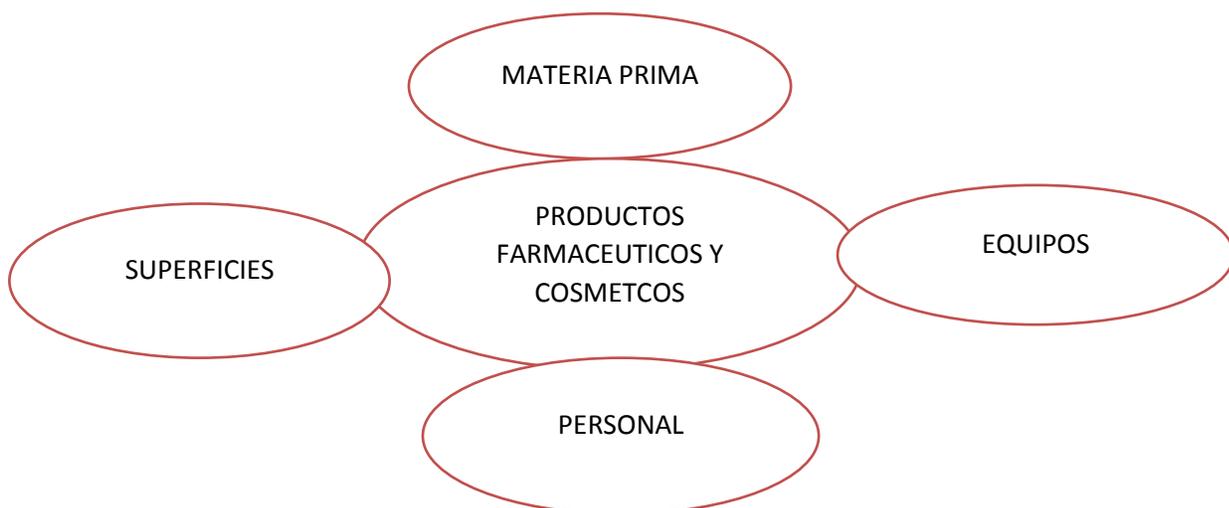
Se consideran oportunistas aquellos microorganismos que producen enfermedad en pacientes inmunocomprometidos (Cerra,H. Fernandez M.C. et al. 2010).

Y son objetables aquellos microorganismo que pueden inactivar drogas activas y/o deteriorar el producto provocando una posible falta de eficacia de los productos farmacéuticos y seguridad en cosméticos (Cerra,H. Fernandez M.C. et al. 2010).

Un medicamento o un cosméticos se consideran contaminados si contienen microorganismos patogénicos, oportunistas, objetables o metabolitos microbianos tóxicos, o si presentan deterioro físico o químico (Cerra,H. Fernandez M.C. et al. 2010).

En la figura 1 podemos ver cuáles son las fuentes más comunes de contaminación de medicamentos y cosméticos:

Figura1. Fuentes de contaminación más frecuentes de productos de uso y consumo humano.





LIMITE MICROBIANO.

Esta es una prueba que permite darle protección al consumidor, ya que asegura la calidad microbiológica del producto. Por lo que la industria farmacéutica reconoce la necesidad de un control microbiológico de estos productos desde el punto de vista: salud pública, estabilidad del producto y financiero.

La contaminación de los productos farmacéuticos, representa un riesgo para la salud del usuario; este riesgo se relaciona con la severidad de la infección o enfermedad de los microorganismo contaminantes, patógenos u oportunista, pueden producir ya que el deterioro microbiano podría conllevar a cambios en la característica física y químicas que conducirán a que el producto deteriorado no sea apto para usarlo.

Este análisis de la materia prima y de los productos farmacéuticos, involucran la realización de dos tipos de ensayos:

- Recuento microbianos, referidos básicamente al recuento total de bacterias aeróbicas mesófilas (BAM) y/o recuento de hongos y levaduras.
- Investigación de microorganismo patógenos objetables, llamados también indicadores específicos, como: *Escherichia Coli, Salmonella, Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus, etc.*

RECUESTO MICROORGANISMO VIABLES (BAM, HONGOS Y LEVADURAS)

Se trata de conocer el número total de microorganismo presentes en el producto. Este número no guarda relación con el microorganismo patógeno por lo que no puede usarse como índice de su presencia.



Dependiendo de las características del medio ha utilizado y de las condición es de incubación los microorganismo analizados serán miembros de poblaciones. En general se investiga la presencia de microorganismo aeróbicos viables, hongos y levaduras.

La técnica consiste en diluir la muestra en un medio de cultivo y luego sembrar una pequeña cantidad de dilución en una placa o bien mezclarla. A continuación, la placa debe de ser incubada en las condiciones adecuadas. Una vez que se han formador colonias visibles, generalmente después de un día, se selecciona para el recuento de colonias las placas en las que estas están bien separadas. Las placas que tiene en 30 a 300 colonias ofrecen una buena relación entre la rapidez del recuento y la precisión en el resultado obtenido. El número de colonias en placa, junto con la de la muestra que se inoculo en ella, nos permite calcular la concentración de células presente en la muestra original.

La ventaja del método de recuento en placa es su gran sensibilidad. Si se utiliza en medios y unas condiciones de incubación adecuadas, puede detectarse una única célula viva. Además el recuento en placa no requiere de un equipo complicado. Un inconveniente es que el recuento en placa es lento y tedioso y no es muy preciso, porque la precisión depende de un número elevado de colonias. La precisión aumenta con el número de colonias que se recuentan, ya que disminuye el error debido al muestreo.

El análisis microbiológico puede ser:

- ✚ Directo: es decir, la muestra se toman de forman directa para inocular en las placas, al medio de cultivo antes de agregarse se le inocula un inactivante para neutralizar los conservadores que incluyen los productos los cuales impiden el crecimiento de microorganismo dando como resultado falsos negativos.
- ✚ Diluciones: la muestra se transfiere al diluyente seleccionado el cual contiene el inactivante.



INVESTIGACION DE MICROORGANISMO OBJETABLES.

Los microorganismos indicadores son aquellas especie cuya presencia indica que los medicamentos estuvieron expuesto a condiciones que pudieron determinar la llegada a los mismos, de microorganismo peligrosos y permitir la proliferación de especies patógenas o toxígenas.

La finalidad por la que se usan los microorganismos indicadores como reveladoras de prácticas de higiene inadecuadas es precisamente para poner de manifiesto determinadas condiciones de tratamiento o manipulación de los medicamentos que supone un peligro potencial.

Los microorganismos de este género más comunes son los siguientes:

- ❖ ***Bacterias aerobias mesófilas (BAM):*** son microorganismos que crecen a 37°C cuyos recuentos se obtienen en placas, los cuales, si son altos, indican la posible proliferación de organismos patógenos dentro de los medicamentos y al mismo tiempo, indican que los medicamentos van a alterarse muy pronto.
- ❖ ***Escherichia coli y coliformes:*** la *E.coli* es una bacteria cuyo hábitat natural es el tracto digestivo del hombre, por lo tanto, su presencia en los medicamentos, es un indicador de contaminación directa o indirecta de origen fecal. Los coliformes son buenos indicadores de una limpieza y desinfección no adecuada o de una industrialización o tratamiento de medicamento incorrectos, favoreciendo la multiplicación de microorganismo patógeno.
- ❖ ***Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa:*** en medicamenos se interpreta como indicativo de contaminación a partir de la piel, boca fosas nasales de los manipuladores de los medicamentos, así como también de material, equipos sucios y de ineficiente temperatura de conservación.



CARACTERISTICAS DE LOS MICROORGANISMOS.

Muchos microorganismos pueden llegar a producir toxinas constituyendo un riesgo sanitario especialmente en formas farmacéuticas orales (*Basillus Cereus*, *Staphylococcus aureus* y hongos filamentosos) o pueden provocar el deterioro de un producto cosmético o de un medicamento como consecuencia de su crecimiento alterado sus características organolépticas. Otros microorganismos patógenos pueden producir distintas enfermedades en los usuarios dependiendo del grado de contaminación y de la susceptibilidad del consumidor. En general los grupos más sensibles son los lactantes, niños y ancianos. A continuación describiremos los microorganismos contaminantes más comunes investigados en medicamentos y cosméticos: (Cerra, H. Fernández M. C. et al. 2010).

✓ *Pseudomona Aeruginosa:*

Es un Bacilo Gram negativo no fermentador de la glucosa, y es uno de los más importantes patógenos dentro de los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia* con respecto al número y tipo de infecciones que causan y su relación con la alta morbilidad y mortalidad relacionada (Pollack, M. 1990)

Este microorganismo combina perfectamente su adaptabilidad a diferentes ambientes con una gran variedad de factores de virulencia. El espectro de enfermedades causadas por este agente varía desde una infección superficial de piel hasta una sepsis (Pollack, M. 1990).

La patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa* se explica por su gran variedad de factores de virulencia. Un Pili polar media la adherencia de este microorganismo a las células epiteliales. Una vez adherida las bacterias produce proteasas, hemolisinas, exotoxinas y endotoxinas que producen daños tisulares. El papel de una elastasa, una de las proteasas producidas por *P. Aeruginosa*, ha sido documentado por su patogénesis de queratitis, infecciones de heridas y enfermedades crónicas de pulmón en pacientes con fibrosis quística (Holder, I. A. 1993).



El rol de la presencia de unas exotoxinas en la patogénesis de las infecciones por *P. Aeruginosa* es desconocido, pero esta toxina podría estar asociada con la diseminación de este microorganismo y su toxicidad sistémica (Pollack M. 1990)

Los individuos inmunocomprometidos son las comunidades más afectadas por infecciones por *P. Aeruginosa* y las causan están frecuentemente asociadas con contaminación de agua y de soluciones acuosa la infección superficial más asociada con este microorganismo es la foliculitis e infecciones del canal auditivo. (Pollack, M. 1990).

La infección de *P. Aeruginosa* en ojos esta frecuentemente asociada al uso de lentes de contactos y de soluciones del lavado de lentes de contactos contaminados con este microorganismo. Esta infección puede llegar a producir úlceras de córnea que puede progresar a una pérdida de la función ocular si no es adecuadamente tratada (Holland, S. P., Pulido J. S., Shyres T. K; and Costerton J. W. 1993).

La infección más severa causada por este microorganismo es la endocarditis por administración intravenosa de medicamentos, cuando, a ser inyectados, son disueltos o suspendidos en vehículos acuosos que, si están contaminados con *P. Aeruginosa* pueden llegar a producir bacteriemias que puede evolucionar a una endocarditis (Pollack M. 1990). De ahí la importancia de investigar la presencia de *P. Aeruginosa* y productos farmacéuticos que van hacer administrado por vía inhalatoria y ocular como así también en vehículos acuoso los cosméticos también puede ser vehículos de este microorganismo en especial los líquidos y cremas (Cerra H. Fernandez M. C. et alt. 2010).

Pseudomonas aeruginosa y otras bacterias Gram negativas pueden colonizar los sistemas de purificación de agua por la formación de biofilms. Estas estructuras una vez formadas son muy difíciles de remover con el uso de agentes sanitizantes (Cerra h. Fernandez M. C. et alt. 2010).



Los Biofilms (o biopelículas) son masas de microorganismos vivos o muertos que se acumulan dentro de los reservorios de agua cañerías u otras superficies inertes como acero inoxidable de equipos y mesado. Otros organismos o materiales pueden ser atrapados en las láminas de biofilms, incluyendo los nematodos, algas, bacterias, hongos y depósitos minerales. La densidad bacteriana en el biofilms pueden estar en el orden del 10^5 a 10^8 UFC/cm² (Cerra H. Fernandez M.C. et al. 2010)

Durante los últimos años se realizaron estudios genéticos que ayudaron a comenzar a entender el complejo proceso de desarrollo de un biofilms (Cerra H. Fernandez M.C. et al. 2010).

✓ **Staphylococcus aureus:**

El género **Staphylococcus** está ampliamente distribuido en la naturaleza se lo encuentra en la piel y mucosa de humanos y de otros primates, es frecuentemente encontrado en la boca, sangre, glándulas mamarias con intestino, tracto genitourinario y vías aéreas respiratorias de sus huéspedes. **Staphylococcus aureus** se trata de un **coccus** Gram positivo perteneciente a la familia micrococcaceae (Wesley E. K. Loods and T Ammy L. B Alnerman. 2005).

Está bien documentado que **S. aureus** es un patógeno oportunista humano y es uno de las mayores causas de infecciones agudas hipogénicas; si no es tratada, puede extenderse al tejido circundante o por vía de una bacteriemia a otros órganos. Muchas de las infecciones causadas por **S. aureus** envuelven la piel con episodios de celulitis, impétigo e infecciones post operatoria en diversos sitios. Otras infecciones mayores en el que está implicado este microorganismo son: Bacteriemia, Neumonía, Osteomielitis, Endocarditis aguda, Meningitis, abscesos en músculos, en otros. (Wesley E. K. Loods and T Ammy L. B Alnerman. 2005).



La presencia del genero *Staphylococcus* y particularmente *S. aureus* en una materia prima o producto farmacéutico en cosmético, indica que la fuente de contaminación puede ser humana, o sea los operadores; estos microorganismos pueden ser transportados por el polvo, piel, ropa y micro gotas de humedad que se genera al moverse al hablar y al estornudar (Wesley E. K. Loods and T Ammy L. B Alnerman. 2005).

✓ *Escherichia coli*:

El tracto gastrointestinal de los animales contiene siempre microorganismo. Se pueden encontrar microorganismo patógeno reconocido como *Salmonella* y *Shigella*, y otros microorganismos nativos como *Staphylococcus epidermides*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Lactobasilos*, diversos miembros de la familia Enterobacteriaceae, clostridios y una gran variedad de protozoos. (Cerra H. Fernandez M.C. et al. 2010).

Los microorganismo Enterobacteriaceae son bacilos Gram negativos anaerobios facultativos que fermentan la glucosa las entero bacterias están ampliamente distribuidas en plantas, suelos y en el intestino de humanos y animales. Están asociados con muchos tipos de infecciones como abscesos, neumonía, meningitis, septicemia e infecciones intestinales, urinarias y heridas (Cerra H. Fernandez M.C. et al. 2010).

Escherichia coli es parte de la flora fecal de humanos y animales inferiores sin embargo algunas cepas pueden producir infecciones del tracto urinario de heridas y entéricas, ocasionalmente pueden producir septicemia o meningitis. (Cerra H. Fernandez M.C. et al. 2010).

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una entidad clínica y anatomopatológica caracterizada por presentación aguda de daño renal anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia, que puede afectar otros parénquimas como intestino, páncreas, corazón y el sistema nervioso central. Esta enfermedad sindrómica pueden presentar dos formas una



típica de etiología infecciosa y de características en demo epidérmicas que está precedida por un periodo prodrómica con diarrea, generalmente sangilolenta, y que puede presentar además fiebre, vómitos y dolor abdominal, la forma atípica puede ser desencadenada por distintos cuadros como neoplasia de hipertensión arterial, rechazo de trasplante renal, uso de anticonceptivos orales drogas, post parto, etc. (Cerra H. Fernández M.C. et alt. 2010).

Su presencia en un producto de uso o consumo humano implicaría una posible presencia de contaminación fecal en especial en producto de consumo oral y en materias primas de origen natural (Cerra H. Fernández M.C. et alt. 2010).

✓ **Salmonella; Salmonella.**

Es un miembro de la familia enterobactereaceae que pueden causar muchos tipos de infecciones desde una gastroenteritis auto limitante hasta afecciones generalizadas como la fiebre tifoidea y paratifoidea. Son bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Se distingue más de 2000 serotipos según una clasificación basada en antígenos somáticos (O) y flagelares (H), conocido como esquema de Kauffmann-White. Sin embargo las Salmonellas que afecta al hombre constituyen un número reducido. La enfermedad más común producida por el género salmonella es la enterocolitis auto limitante con episodios febriles y diarrea generalmente con una duración de 7 días (Cerra H. Fernández M.C. et alt. 2010).

Una vez que se ha ingerido la salmonella con un producto contaminado pasa a través del estómago y comienza a multiplicarse y se adhiere al borde en cepillo de las células epiteliales que tapiza la porción distal del intestino delgado del colon. Luego las bacterias penetran en las células de las mucosas que resultan dañada, inmigran a la lámina propia de la región ileocecal. Tras una posterior multiplicación en folículos linfoideos se desarrolla una respuesta leucociticas seguida de hiperplasia e hipertrofia del retículo endotelial. Esta respuesta inflamatoria también induce la liberación de prostaglandinas, que estimula el cAMP y produce una activa secreción de fluido que se manifiesta en una diarrea profusa.



Típicamente el periodo de incubación es de aproximadamente de 12 a 36 hrs (Cerra H. Fernández M.C. et al. 2010).

La ***Salmonella*** se encuentra ampliamente difundida en la naturaleza y como flora normal del tracto intestinal de animales y humano. Se distingue de otros microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales en que su presencia puede ser habitual en materias primas de origen natural, en especial aquellas de origen natural. Poseen una gran habilidad de multiplicarse en un amplio rango de temperaturas, alcanzando recuentos muy elevados. Puede ser fácilmente diseminada y transmitidas de una persona a otra. Puede producirse un prolongado periodo de excreción del microorganismo tras la infección produciéndose lo que se conoce como estado de portador. Dada la etiología de este microorganismo es de fundamental importancia su investigación en materia prima sintética y de origen natural (Cerra H. Fernández M.C. et al. 2010).

Hongos filamentosos y levaduras.

Muchos hongos saprofitos, mohos y levaduras ambientales suelen estar ligados a contaminaciones de medicamentos y cosméticos. (Cerra H. Fernández M.C. et al. 2010).

Los hongos son organismo eucariotas, es decir que presentan núcleos verdaderos con membrana nuclear y cromosomas. Estas características los distingue de las bacterias, organismos procariontes sin núcleo y con un solo cromosomas libre en el citoplasma (Cerra H. Fernández M.C. et al. 2010).

Desde el punto de vista nutricional son heterótrofos, al igual que los animales, ya que no sintetizan la materia orgánica a partir de CO₂. Los hongos requieren, a diferencia de las plantas, de fuentes de carbono orgánicas, pero a diferencia de las plantas, de fuentes de carbono orgánicas, pero a diferencia de los animales debido a la pared que presentan pro absorción de nutrientes solubles en lugar de hacerlo por ingestión de alimentos particulados seguida de digestión. Los hongos digieren los alimentos externamente liberando enzimas y



ácidos que hidrolizan las macromoléculas del sustrato y absorben las subunidades (nutrición absorptiva) (Cerra H. Fernández M.C. et al. 2010).

Los hongos patógenos aislados con más frecuencia son cepas de *Aspergillus* y *Candida*. *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus* son mohos que producen micosis sistémicas en pulmón llamada *Aspergillosis*. La levadura *Candida albicans*, que es huésped normal de la flora intestinal del hombre, produce candidiasis superficial o sistémica en personas debilitadas, en recién nacidos y en ancianos como sistema inmunológico deficiente. Los hongos saprofitos oportunistas, tanto mohos como levaduras, pueden producir alergias y micosis secundarias comportándose como verdaderos patógenos.

Los hongos toxicogénicos son frecuentes en todo tipo de productos siendo lo más importantes *A. flavus* y *A. parasiticus*, productores de aflatoxinas. Las aflatoxinas, metabolitos secundarios hepatotóxicos y potentes carcinogénicos, deben ser consideradas como indicadores de riesgo tóxico. El empleo de descontaminantes, si bien garantiza la ausencia de estos hongos toxicogénicos, no asegura la destrucción de la toxina porque estos metabolitos son resistentes al calor y a los tratamientos que reciben las materias primas de origen natural como por ejemplo la descontaminación por radiación ionizante (Cerra H. Fernández M.C. et al. 2010).

Los productos más susceptibles a la contaminación fúngica son las soluciones oftálmicas, ungüentos, cremas, supositorios, pomadas y en cosméticos, jabones y talcos, y otros que contienen nutrientes ricos en hidratos de carbono y ácidos grasos. Los excipientes y materias primas derivados de cereales, son también óptimos sustratos para el desarrollo de cepas de *A. flavus*, productores de aflatoxinas. Las hierbas medicinales y medicamentos fitoterapéuticos pueden ser vehículos también de estos microorganismos (Cerra H. Fernández M.C. et al. 2010).



✓ **Candida albicans:**

Las levaduras son esenciales hongos unicelulares que aunque son morfológicamente simples constituyen un grupo altamente especializado asociados con ambientes nutricionales muy dispares. Unas pocas especies de levaduras son potencialmente patógenas para el hombre aunque muchas están relacionadas con procesos de alteración de productos (Cerra H. Fernández M.C. et al. 2010).

Candida albicans es un hongo diploide asexual (forma de levadura), saprofito de la familia de los Sacaromicetos. Normalmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vaginal. Puede asumir patogenicidad provocando candidiasis; en ese caso se presenta como una afección vaginal (vaginitis), de la cavidad oral (muget), del tracto gastrointestinal, o de la pies (Cerra H. Fernández M.C. et al. 2010).

Según la RTCA 71.04.36:07 exige los siguientes parámetros de productos cosméticos:

OBJETO

Este reglamento tiene por objeto establecer las pruebas analíticas de control que deben ser evaluadas para comprobar la calidad de los cosméticos y asegurar a la población que mantienen sus características de acuerdo a sus especificaciones.

ÁMBITO DE APLICACIÓN

Las disposiciones de este reglamento son de aplicación para todos los cosméticos importados y fabricados en los países de la región Centroamericana.

3. DOCUMENTOS A CONSULTAR

RTCA 71.04.36:07 Productos Cosméticos. Etiquetado.



DEFINICIONES

Autoridad reguladora: Ente responsable del Registro Sanitario y/o Vigilancia Sanitaria de cada país Centroamericano.

Cosmético: Es toda sustancia o preparado destinado a ser puesto en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistemas piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto y corregir los olores corporales y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado.

Los productos de higiene personal se consideran cosméticos.

Ingrediente activo: Toda sustancia o mezcla de sustancias que tengan alguna actividad cosmética específica.

EVALUACIÓN TÉCNICA

Etiquetado. Debe cumplir con el RTCA 71.04.36:07 Productos Cosméticos. Etiquetado.

Pruebas y Especificaciones

En todos los cosméticos, se debe evaluar:

Características organolépticas (aspecto, sabor, color y olor)

Pruebas físicas:

- pH
- Densidad (cuando aplique)
- Viscosidad (cuando aplique)



Cuando el fabricante efectúe otras pruebas físicas debe declararlas.

Las especificaciones de las pruebas físicas serán de acuerdo a las características propias de cada forma cosmética y lo establecido por el fabricante.

Pruebas químicas:

Se deben efectuar pruebas identificación y de contenido de ingredientes activos y el de aquellas sustancias químicas restringidas, cuando aplique, que figuran en la última versión del documento denominado “Texto consolidado CONSLEG:1976L0768. Anexo Producido por el sistema CONSLEG de la Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas”. Las especificaciones a cumplir se encuentran establecidas en dicho documento.

Pruebas microbiológicas:

Límites microbianos

Deben efectuarse a todos los cosméticos, excepto a los que no sean susceptibles a la contaminación microbiológica por la propia naturaleza del cosmético (ej. Perfumes con alto contenido de alcohol, productos con más de 10% de clorhidrato de aluminio, productos oleosos, productos con base de cera, productos que contienen peróxidos).

Control microbiológico

Estos ensayos se basan en la capacidad de determinar la presencia de microorganismo a través del uso de medios de cultivos: nutritivos, de enriquecimiento, selectivos y/o diferenciales, capaces de permitir su recuperación a partir de materias primas o productos no estériles y/o de evidenciar ciertas características bioquímicas, producto de metabolismo de los diferentes microorganismo a investigar (Abad Lopez; Diaz Sanchez; et al. 2016)

La diversidad y el número de microorganismo presentes en un producto no obligatoriamente estéril van a estar influenciados por distintos factores:



➤ **Intrínsecos a la formulación:**

Drogas activas con acción antimicrobiana, conservadores, Ph, contenido de nutrientes, actividad acuosa, presión osmótica, potencial de óxido-reducción y calidad higiénica de las materias primas empleadas en especial las de origen natural.

➤ **Extrínsecos:**

Condiciones higiénicas durante la manufactura; contenido microbiano del material de empaque.

Tabla N°1. Especificación de Límites microbianos según RTCA 71.04.36:07. Expresados en UFC/g o UFC/cm³

PRODUCTO	DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN
Para Bebé	Recuento Total de Mesófilos aerobios	$\leq 10^2$
	Recuento Total de Mohos y Levaduras	$\leq 10^2$
Para el contorno de ojos	Recuento Total de Mesófilos aerobios	no más de 5×10^2
	Recuento Total de Mohos y Levaduras	$\leq 10^2$
Todos los otros	Recuento Total de Mesófilos aerobios	$\leq 10^3$
	Recuento Total de Mohos y Levaduras	$\leq 10^2$

Tabla N°2. Especificación de microorganismos patógenos.

MICROORGANISMO	ESPECIFICACIÓN
<i><u>Staphylococcus aureus</u></i>	Ausente
<i><u>Escherichia coli</u></i>	Ausente
<i><u>Pseudomonas aeruginosa</u></i>	Ausente



MEDIOS DE CULTIVOS.

Los medios de cultivo es aquella solución que muestran los nutrientes necesarios para recuperar, multiplicar, aislar e identificar los microorganismos bajo las condiciones favorables de temperatura y pH. Debido a la variabilidad de los resultados microbiológicos, el tema de los medios de cultivos juega un rol muy importante, junto a otros principios, dentro de las buenas prácticas de un laboratorio Microbiológico. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

El desarrollo adecuado de los microorganismos en un medio de cultivo se ve afectado por una serie de factores de gran importancia y que en algunos casos, son completamente ajenos al propio medio:

Disponibilidad de nutrientes adecuados.

Un medio de cultivo adecuado para la investigación microbiológica ah de contener como mínimo carbono, nitrógeno, azufre, fosforo y sales orgánicas en muchos casos serán necesarios ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras de crecimiento. Todas estas sustancias se suministraban originalmente en forma de infusión de carne, extracto de carne o extractos de levaduras. Sin embargo, la preparación de estas sustancias para su aplicación a los medios de cultivos provoca la pérdida de los factores nutritivos labiales. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Consistencia adecuada del medio

Partiendo de medios líquidos podemos modificar su consistencia añadiendo productos como albumina, gelatina o agar con lo que obtendríamos medios en estados solidos o semisólidos. Los medios solidificados con gelatina tienen el gran inconveniente de que muchos microorganismos no se desarrollen adecuadamente a temperaturas inferiores al punto de fusión de este solidificante y de que otros tiene la capacidad de licuarlas.



Actualmente los medios solidos son de uso universal, por si versatilidad y comodidad pero hay también gran cantidad de medios líquidos cuyo uso está ampliamente extendido en el laboratorio. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Presencia (o ausencia) de oxígeno y otros gases.

Gran cantidad de bacterias pueden crecer en una atmosfera con tensión de oxigeno normal. Algunas pueden obtener el oxígeno directamente de varios sustratos. Pero los microorganismos anaerobios estrictos solo se desarrollan adecuadamente en una atmosfera sin oxígeno ambiental. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Condiciones adecuadas de la humedad.

Un nivel mínimo de humedad, tanto en el medio como en la atmósfera, es imprescindible para un buen desarrollo de las células vegetativas microbianas en los cultivos. Hay que prever el mantenimiento de estas condiciones mínimas en las estufas de cultivo a 35-37 °C cuando sea necesario que mantenga la humedad necesaria para el crecimiento de los cultivos y evitar así que se deseeque el medio. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Luz ambiental.

La mayoría de los microorganismos crecen mucho mejor en la oscuridad que en presencia de luz solar. Hay excepciones evidentes como sería el caso de los microorganismos fotosintéticos. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

pH.

La concentración de iones hidrógeno es muy importante para el crecimiento de los microorganismos. La mayoría de ellos se desarrollan mejor en medios con un pH neutro, aunque los hay que requieren medios más o menos ácidos. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).



Temperatura.

Los microorganismos mesófilos crecen de forma óptima a temperaturas entre 15 y 43 °C. Otros como los psicrófilos crecen a 0° C y los termófilos a 80° C o incluso a temperaturas superiores (hipertemófilos). En líneas generales, los patógenos humanos crecen en rangos de temperatura mucho más reducidos, alrededor de 37° C, y los saprófitos desarrollan en rangos más amplios. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Esterilidad del medio.

Todos los medios de cultivo han de estar perfectamente estériles: - para evitar la aparición de formas de vida que puedan alterar, enmascarar o incluso impedir el crecimiento microbiano normal del o de los especímenes inoculados en dichos medios. - para que el resultado obtenido sea el correspondiente al nivel de contaminación de la muestra a analizar. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Clasificación de los medios de cultivos según su consistencia, su utilización, su composición y su origen.

Según su consistencia (estado físico):

Según su consistencia, los medios de cultivo pueden ser líquidos, sólidos o semisólidos.

Medios líquidos: Como se presentan en ese estado son llamados también caldos.

Medios sólidos: Se preparan a través de medios líquidos agregándoles un agente gelificante. Los más utilizados con la gelatina y el agar. La gelatina es una proteína animal obtenida de los huesos. Tiene la limitación de que es hidrolizada por muchas bacterias y porque su punto de fusión es bajo. El agar es un polímero de azúcares obtenido de algas



marinas. Es una molécula insoluble en agua fría pero soluble en agua caliente. Una solución de 1,5 % forma un gel firme entre 32 y 39 °C. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Medios semisólidos: Se preparan a partir de los medios líquidos agregándoles un agente solidificante en una proporción menor que para preparar medios sólidos. Uno de sus principales usos es para la investigación de la movilidad de los microorganismos. Poseen 0,15 % de agar. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Según su utilización:

Según su utilización los medios de cultivo pueden clasificarse en medios comunes, medios de enriquecimiento, selectivos, diferenciales, de identificación, de conservación y de transporte. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Medios comunes: Son aquellos que poseen los componentes mínimos para que pueda producirse el crecimiento de microorganismos que no necesiten requerimientos especiales. El más conocido es el agar nutritivo o agar común, resultante de la adición de agar al caldo nutritivo. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Medios de enriquecimiento: Son aquellos que, además de las sustancias nutritivas normales, incorporan una serie de factores indispensables para el crecimiento de microorganismos exigentes o fastidiosos. Este enriquecimiento se hace por agregado de por ejemplo: sangre, leche, bilis, huevo, et. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Medios selectivos: Son aquellos utilizados para favorecer el crecimiento de ciertas bacterias inhibiendo el desarrollo de otras, ya que poseen una sustancia inhibitoria. Ejemplo: el agar Mac Conkey posee sales biliares y cristal violeta que inhiben las bacterias Gram positivas. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).



Medios diferenciales: Se utilizan para poner en evidencia características bioquímicas que ayuden a diferenciar géneros o especies. Contienen compuestos químicos o indicadores sobre los que determinados microorganismos adquieren coloraciones específicas o reaccionan de una manera determinada. Ejemplo: el agar EMB tiene eosina y azul de metileno que nos permite diferenciar *Escherichia coli* la cual forma colonias verdes (con brillo metálico a la luz reflejada), de otras enterobacterias que forman colonias de color rosa salmón. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Medios de identificación: Son aquellos que se utilizan para poner en evidencia alguna cualidad bioquímica que nos permite reconocer la identidad de un microorganismo. Ejemplo: el Agar Kligler que permite determinar la capacidad de un microorganismo de atacar un hidrato de carbono específico, con producción o no de gas, junto con la posible producción de ácido sulfhídrico. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Medios de conservación: Se utilizan para conservar una cepa microbiana. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Medios de transporte: Se usan por ejemplo para el transporte de muestras clínicas e hisopos que fueron utilizados en el control de superficies que no pueden sembrarse inmediatamente. Ejemplo: medio Cary Blair el cual es especialmente útil para la búsqueda de *Vibrio* spp. A partir de muestras rectales. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Según su composición:

Según su composición los medios de cultivo pueden ser complejos o indefinidos, sintéticos o definidos, o semisintéticos:

Medios complejos o indefinidos: Son aquellos cuya composición química exacta se desconoce ya que son el producto de realizar infusiones y extractos de materiales naturales



complejos. Son medios muy ricos nutricionalmente aunque indefinidos químicamente. Ejemplo: digeridos de extracto de carne o extracto de levadura. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Medios sintéticos o definidos: Son aquellos que contienen en su composición exclusivamente sustancias químicas conocidas y disueltas en agua en proporciones determinadas, resultando un medio de composición perfectamente definida. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Medios semisintéticos: Es una mezcla de los medios anteriores. Llevan algunas sustancias químicas cuya naturaleza y cantidad conocemos, junto con sustancias de naturaleza y composición indefinidas. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Según su origen:

Según su origen los medios de cultivo pueden clasificarse en naturales, sintéticos o semisintéticos.

Naturales: Son los preparados a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal. Ejemplo: extracto de tejidos o infusiones cuya composición química no se conoce exactamente. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Sintéticos: Son los que contienen una composición química cuali y cuantitativamente definida. Se utilizan para obtener resultados reproducibles. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).



Semisintéticos: Son los medios sintéticos a los cuales se les agregan factores de crecimiento bajo una forma de extracto orgánico complejo, como por ejemplo extracto de levadura. (Cerra, H. Fernandez M.C. et. Al.2010).

Prueba preliminar

La validez de este conjunto de pruebas se basa en su capacidad para poner en evidencia el microorganismo presente en un producto farmacéutico.

Por esta razón, antes de establecer en forma rutinaria el análisis de un producto, es necesario demostrar que bajo las condiciones de prueba, es posible recuperar al microorganismo control previamente inoculado en la muestra.

Microorganismo control

Staphylococcus aureus ATCC 6538P, NCIMB 9518, CIP 4.83 o NBRC 13276

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 o NBRC 13275

Salmonella typhi ATCC 14028

Escherichia Coli ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126 o NBRC 3972



Preparación de los microorganismo control.

A partir de cultivos de 18 a 24 horas de incubación en caldo soya tripticaseina, de cada uno de los microorganismos control, preparar disoluciones decimales (por lo menos hasta 10^{-3})

Inocular 1ml de la suspensión anterior en la primera disolución del producto, preparada como se indica en la sección de investigación de microorganismo objetable y continuar con el procedimiento para cada uno de los microorganismos control.

Si al finalizar el procedimiento alguno de lo microorganismo control no se recupera en los medios señalados para este propósito, modificarlo considerando las siguientes posibilidades:

- Aumentar el volumen de diluyente manteniendo constante la calidad de producto.
- Neutralizar la acción de la gente inactivante (tabla 3)
- Combinación de los dos procedimientos anteriores.
- Emplear el método de filtración (cuando proceda)



En la tabla N°3. Se detallan los preservativos más comunes en productos cosméticos no estériles y los agentes inactivantes.

Preservativo	Agente Inactivante.
ALCOHOLES	
Clorobutanol	Polisorbato 20 o 80 al 10%
Feniletil alcohol.	Polisorbato 20 o 80 al 10%
ESTERES.	
Metil p-hidroxibenzoato al 0.18%	Polisorbato 20 o 80 al 5%
Propil p-hidroxibenzoato al 0.02%	Lecitina al 0.07% y polisorbato 80 al 0.5%
MERCURIALES	
Nitrato o acetato fenil mercurio al 0.0002%	Lecitina al 0.5% y polisorbato 80 al 3%
SALES CUATERNARIA DE AMONIO	
Cloruro benzoalconio	Lecitina al 0.5% y polisorbato 80 al 3%
PENICILINA	Penicilinasas
SULFAS	Acido para-amonio benzoico (PABA)

Como se observa en la tabla N°3, la lecitina de soya y el polisorbato son sustancias que inactivan a la mayoría de los preservativos empleados en la industria farmacéutica, por lo tanto una posibilidad de eliminar la actividad antimicrobiana del producto de prueba es



emplear diluyentes y medios de cultivos adicionados de lecitina y polisorbato en las proporciones recomendadas.

Preparación de la muestra.

De acuerdo a las características físicas de la muestra, elegir el método adecuado para obtener una solución, suspensión o emulsión sin alterar el número y clase de microorganismo. Los métodos de preparación de la muestra se describen a continuación, y constituyen la primera dilución del producto (10^{-1}). Dilución que puede hacerse con solución diluida de fosfatos de ph 7.2, caldo digerido de caseína-soya-lecitina-polisorbato, caldo soya tripticaseína o caldo lactosado. Cuando se analiza líquidos no miscibles en agua, ungüentos o ceras, es necesario utilizar diluyentes adicionando el polisorbato 20 a concentraciones del 1 al 10%.

Sólidos y líquidos miscibles en agua.

Pesar o medir exactamente 10g o 10ml de muestra y transferirlo a 90ml del diluyente seleccionado.

Sólidos insolubles, tabletas y grageas

Pulverizar la cantidad necesaria de muestra para obtener 10g y transferir a 90ml del diluyente seleccionado.

Líquido no miscible en agua.

Medir exactamente 10ml del producto, transferirlo a 90ml del diluyente seleccionado adicionando de polisorbato 20.



Ungüentos y ceras.

En un vaso de precipitado estéril, pesar 10g de la muestra, agregar la cantidad mínima necesaria de polisorbato 20 (1 a 10ml) para que al agitar con una barra magnética estéril se forme una pasta, calentar en un baño de agua a una temperatura que no exceda de 45°C y agregar gradualmente el volumen necesario para completar 90ml con el diluyente seleccionado.

Líquidos viscosos.

Para muestras viscosas que no pueda medirse con pipeta en la dilución 1:10 efectuar diluciones 1:100 o 1:500.

Métodos de recuento microbiano.

Los métodos descriptivos en el presente ítem son los detallados en la Farmacopea Americana para el recuento de microorganismo (USP36).

1. Preparación de los microorganismos de ensayo (USP 36).

Se recomienda utilizar suspensiones de cepas de ensayo de colecciones reconocidas prepararlas como se indica a continuación.

Es conveniente aplicar técnicas de mantenimiento de cultivo de lote de siembra (sistemas de lote de siembra) de modo que los microorganismos viables utilizados para la inoculación no hayan experimentado más de 5 pasajes a partir del lote de siembra primario original.

Cultivar por separado cada una de las cepas bacterianas y fúngicas de ensayo como se describe en la Tabla 3.



Para la preparación de las suspensiones de microorganismos es conveniente utilizar una solución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0 o un tampón fosfato a pH 7,2.

Para preparar la suspensión de *B. subtilis*, se prepara una suspensión estable de esporas y a continuación se usa para la inoculación un volumen apropiado de la misma. Esta suspensión de esporas puede mantenerse a 2-8 °C durante un periodo de tiempo validado.

2. Control negativo (USP 36).

Para verificar las condiciones de trabajo resulta conveniente preparar un control negativo utilizando el diluyente elegido en lugar de la preparación a examinar. No se debe observar ningún crecimiento de microorganismos. Un resultado no conforme en el control negativo, requiere una investigación.

3. Ensayo de fertilidad de los medios de cultivo (USP 36).

Analizar cada lote de medio, ya sea adquirido listo para su uso o preparado a partir de un medio deshidratado o a partir de los ingredientes descritos de acuerdo a un análisis de riesgo.

Sembrar los medios de cultivo líquidos y las placas conteniendo medios de cultivo sólidos para recuento (como máximo 100 UFC) con los microorganismos indicados en la Tabla 3. Utilizando una porción de caldo / placa con medio distinta para cada uno. Incubar en las condiciones descritas en la Tabla 3.

Para los medios sólidos, el crecimiento obtenido no debe diferir en un factor superior a 2 del valor calculado para un inóculo normalizado. Para un inóculo recién preparado, se debe observar un crecimiento de los microorganismos comparable al obtenido con un lote de medio previamente controlado y aprobado.



Los medios líquidos se pueden considerar adecuados si se observa un crecimiento claramente visible de los microorganismos comparable al obtenido con un lote de medio previamente controlado y aprobado.

4. Idoneidad del método de recuento en presencia de producto (USP 36).

Preparación de la muestra.

La preparación de la muestra depende de las características físicas del producto a examinar. Si no se puede demostrar que es satisfactorio ninguno de los procedimientos descritos a continuación, es necesario desarrollar un procedimiento alternativo.

Productos hidrosolubles: Disolver o diluir (generalmente se prepara una dilución 1 en 10) el producto a examinar en solución tamponada de peptona-cloruro de sodio a pH 7,0, tampón fosfato a pH 7,2 o caldo con hidrolizado de caseína y de soja. Si es necesario, ajustar a pH 6-8. Puede ser necesaria la preparación de diluciones adicionales con el mismo diluyente.

Tabla N°4. Preparación y Uso de microorganismo de prueba (USP36)

Microorganismo	Preparación de Cepas de Prueba	Promoción de Crecimiento		Aptitud del método de Recuento en presencia del producto	
		Recuento Total de Microorganismos Aerobios	Recuento Total de Hongos Filamentosos y Levaduras	Recuento Total de Microorganismos Aerobios	Recuento Total de Hongos Filamentosos y Levaduras
		Staphylococcus aureus. por ejemplo ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 o NBRC 13276	Agar Digerido de Caseína y Soja o Caldo Digerido de Caseína y Soja 30° - 35°, por 18 – 24 horas	Agar Digerido de Caseína y Soja o Caldo Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC, 30° - 35° ≤ 3 días.	Agar Digerido de Caseína y Soja/NMP Caldo Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC, 30° - 35° ≤ 3 días.
Pseudomonas aeruginosa, por ejemplo ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118	Agar Digerido de Caseína y Soja o Caldo Digerido de Caseína y Soja 30° - 35°, por 18 – 24 horas	Agar Digerido de Caseína y Soja o Caldo Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC, 30° - 35° ≤ 3 días.	Agar Digerido de Caseína y Soja/NMP Caldo Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC, 30° - 35° ≤ 3 días.		



o NBRC 13275	horas	días.			≤ 3 días.
Bacillus subtilis por ejemplo ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52. 62 o NBRC 3134	Agar Digerido de Caseína y Soja o Caldo Digerido de Caseína y Soja 30° - 35°, por 18 – 24 horas	Agar Digerido de Caseína y Soja o Caldo Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC, 30° - 35° ≤ 3 días.			Agar Digerido de Caseína y Soja/NMP Caldo Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC, 30° - 35° ≤ 3 días.
Candida albicans por ejemplo ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 o NBRC 1594	Agar Sabouraud Dextrosa o caldo Sabouroud Dextrosa 20° - 25° por 2 – 3 días	Agar Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC, 30° - 35° ≤ 5 días.	Agar Sabouraud Dextrosa ≤ 100 UFC, 20° - 25° ≤ 5 días.	Agar Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC, 30° - 35° ≤ 5 días.	Agar Sabouraud Dextrosa ≤ 100 UFC, 20° - 25° ≤ 5 días. NMP, no aplica
Aspergillus brasiliensis por ejemplo ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83 o NBRC 9455	Agar Sabouraud Dextrosa o Agar papa dextrosa 20° - 25° por 5 – 7 días o hasta alcanzar una buena esporulación	Agar Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC, 30° - 35° ≤ 5 días.	Agar Sabouraud Dextrosa ≤ 100 UFC, 20° - 25° ≤ 5 días.	Agar Digerido de Caseína y Soja ≤ 100 UFC, 30° - 35° ≤ 5 días.	Agar Sabouraud Dextrosa ≤ 100 UFC, 20° - 25° ≤ 5 días. NMP, no aplica

5. Inoculación y Dilución (USP36)

Agregar a la muestra, preparada según las instrucciones previas, y a un control (sin incluir material de la prueba) un volumen suficiente de suspensión microbiana para obtener un inóculo de no más de 100 ufc. El volumen de la suspensión del inóculo no debe exceder del 1 % del volumen del producto diluido.

Para demostrar una recuperación microbiana aceptable del producto, se debe usar el factor de dilución más bajo posible de la muestra preparada para la prueba. Si esto no fuera posible debido a la actividad antimicrobiana o la baja solubilidad, deben desarrollarse otros protocolos adecuados.



Si la inhibición del crecimiento por la muestra no puede evitarse de cualquier otra manera, la alícuota de suspensión microbiana puede agregarse después de la neutralización, la dilución o la filtración.

6. Neutralización/eliminación de la actividad antimicrobiana (USP36).

El número de microorganismos recuperados a partir de la muestra preparada, diluida e incubada como se ha descrito previamente, se debe comparar con el número de microorganismos recuperados de la preparación control.

En caso de inhibición del crecimiento (reducción en un factor mayor que 2), modificar el procedimiento a seguir para el ensayo particular de recuento para garantizar la validez de los resultados.

La modificación del procedimiento puede incluir, por ejemplo:

- 1) un aumento del volumen del diluyente o del medio de cultivo.
- 2) la incorporación al diluyente de agentes neutralizantes específicos o generales.
- 3) una filtración por membrana, o
- 4) una combinación de las modificaciones anteriores.

7. Agente neutralizante (USP36)

Estos agentes pueden utilizarse para neutralizar la actividad de los agentes antimicrobianos (Tabla 3) añadiéndolos al diluyente elegido o al medio preferiblemente antes de la esterilización. Si se utilizan, su eficacia y su ausencia de toxicidad para los microorganismos se deben demostrar preparando un blanco con neutralizante y sin producto respectivamente.

Si no se puede encontrar ningún método de neutralización adecuado, se puede suponer que la imposibilidad de aislar el organismo inoculado es debido a la actividad microbicida del producto. Esta información sirve para indicar que no es probable que el producto sea



contaminado con la especie dada del microorganismo. Sin embargo, es posible que el producto sólo inhiba algunos de los microorganismos pero que no inhiba otros no incluidos entre las cepas de ensayo o para los que estas últimas no son representativas.

8. Recuperación de microorganismo en presencia de producto (USP36)

Efectuar ensayos separados para cada uno de los microorganismos citados. Sólo se deben tener en cuenta los microorganismos de la cepa de ensayo añadida.

a. Filtración por membrana (USP 36).

Utilizar membranas filtrantes que tengan un tamaño de poro nominal no superior a 0,45 µm. El tipo de material filtrante se elige de tal forma que la eficacia de retención de las bacterias no se vea afectada por los componentes de la muestra a examinar. Se debe utilizar una membrana filtrante para cada microorganismo ensayado.

Transferir a la membrana filtrante una cantidad adecuada de la muestra preparada como se ha descrito anteriormente (preferentemente equivalente a 1 g del producto, o menos si se esperan números elevados de UFC), filtrar inmediatamente y lavar la membrana filtrante con un volumen apropiado de diluyente.

Para la determinación del recuento de microorganismos aerobios totales (RMAT), transferir la membrana filtrante a la superficie del agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja. Para la determinación del recuento de levaduras / mohos combinados totales (RLMT), transferir la membrana a la superficie del agar-agar glucosado de Sabouraud. Incubar las placas como se indica en la Tabla 4. Efectuar el recuento.



b. Métodos de recuento en placa (USP 36).

Realizar los métodos de recuento en placa al menos por duplicado para cada medio y utilizar el valor promedio de los resultados.

✓ **Método de vertido en placa**

Para placas de Petri de 9 cm de diámetro, añadir a la placa 1 mL de la muestra preparada anteriormente y 15-20 mL de agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja o agar-agar glucosado de Sabouroud, estando ambos medios a una temperatura no superior a 45 °C.

Si se utilizan placas de Petri más grandes, la cantidad de medio de agar-agar se aumenta proporcionalmente. Para cada uno de los microorganismos citados en la Tabla 4 se usan al menos 2 placas de Petri. Incubar las placas como se indica en la Tabla 4. Obtener la media aritmética de los recuentos por medio y calcular el número de UFC en el inóculo original.

✓ **Método de extensión en superficie**

Para placas de Petri de 9 cm de diámetro, añadir a cada placa 15-20 mL de agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja o de agar-agar glucosado de Sabouraud a una temperatura de aproximadamente 45 °C y dejar que solidifique. Si se usan placas de Petri más grandes, el volumen del agar-agar se aumenta proporcionalmente. Secar las placas, por ejemplo en una cabina de flujo laminar o en una incubadora. Para cada uno de los microorganismos citados en la Tabla 4 se usan al menos 2 placas de Petri. Extender un volumen medido, no inferior a 0,1 mL de la muestra preparada sobre la superficie del medio. Incubar y contar.

✓ **Método del número más probable (NMP) (USP 36).**

La precisión y la exactitud del método del NMP son inferiores a las del método de filtración por membrana y a las del método de recuento en placa. Se obtienen resultados poco fiables particularmente en el recuento de mohos. Por estas razones el método del NMP se reserva para el RMAT cuando no se dispone de ningún otro método. Si la utilización del método está justificada, proceder como sigue.



Preparar una serie de al menos 3 diluciones 1/10 del producto. De cada nivel de dilución se usan 3 partes alícuotas de 1 g o 1 mL para inocular 3 tubos que contienen cada uno 9-10 mL de caldo con hidrolizado de caseína y de soja. Si es necesario, se puede añadir al medio un agente tensioactivo, tal como polisorbato 80 o un inactivador de los agentes antimicrobianos. Por tanto, si se preparan 3 niveles de dilución, se siembran 9 tubos.

Incubar todos los tubos a 30-35 °C durante un máximo de 3 días. Si la lectura de los resultados es difícil o incierta debido a la naturaleza del producto a examinar, efectuar un subcultivo en el mismo caldo, o en agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja, durante 1-2 días a la misma temperatura y utilizar estos resultados. Determinar el número más probable de microorganismos por gramo o mililitro del producto a examinar a partir de la Tabla 5.

Tabla N°5. Valores del número más probable de microorganismo (USP36).

Combinación observada de Números de tubos que muestran crecimiento en cada juego.			NMP por g o por ml de producto.	Límite de confianza de 95%
Numero de g o ml de producto por tubo				
0.1	0.01	0.001		
0	0	0	<3	0-9.4
0	0	1	3	0.1-9.5
0	1	0	3	0.1-10
0	1	1	6.1	1.2-17
0	2	0	6.2	1.2-17
0	3	0	9.4	3.5-35



1	0	0	3.6	0.2-17
1	0	1	7.2	1.2-17
1	0	2	11	4-35
1	1	0	7.4	1.3-20
1	1	1	11	4-35
1	2	0	11	4-35
1	2	1	15	5-38
1	3	0	16	5-38
2	0	0	9.2	1.5-35
2	0	1	14	4-35
2	0	2	20	5-38
2	1	0	15	4-38
2	1	1	20	5-38
2	1	2	27	9-94
2	2	0	21	5-40
2	2	1	28	9-94
2	3	0	29	9-94
2	3	1	36	9-94
3	0	0	23	5-94
3	0	1	38	9-104
3	0	2	64	16-181
3	1	0	43	9-181
3	1	1	75	17-199
3	1	2	120	30-360
3	1	3	160	30-380
3	2	0	93	18-360
3	2	1	150	30-380
3	2	2	210	30-400



9. Interpretación de los resultados (USP36)

El recuento de microorganismos aerobios totales (RMAT) se considera igual al número de UFC encontrado utilizando agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja; si en este medio se detectan colonias de hongos, se contabilizan como parte del RMAT. El recuento de levaduras / mohos combinados totales (RLMT) se considera igual al número de UFC encontrado utilizando agar-agar glucosado de Sabouraud; si en este medio se detectan colonias de bacterias, se contabilizan como parte del RLMT. Si se espera que el RLMT sobrepase el criterio de aceptación debido al crecimiento bacteriano, puede usarse agar-agar glucosado de Sabouraud que contenga antibióticos. Si el recuento se efectúa por el método del NMP, el valor calculado es el RMAT.

El criterio de aceptación en materia de calidad microbiológica, se interpreta como sigue:

10¹ UFC: número máximo aceptable = 20;

10² UFC: número máximo aceptable = 200;

10³ UFC: número máximo aceptable = 2000, y así sucesivamente.

INVESTIGACION DE MICROORGANISMO OBJETABLE (USP36)

En función de la vía de administración de producto, proceder a la investigación de los microorganismos señalados a continuación:

✚ Producto dérmicos, rectales y vaginales:

Pseudomona aeruginosa y ***Staphylococcus aureus***.

✚ Productos orales:

Escherichia Coli y ***Salmonella***. (Cuando la monografía correspondiente la indique).

✚ Materia prima:

Dependiendo de la vía de administración del producto, investigar los microorganismos señalados, además de ***Pseudomona***.



Identificación de *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. (USP36)

- Preparación de la muestra y pre-incubación.

Pesar o medir 10g o ml de la muestra y adicionarlo a 90ml de caldo con hidrolizado de caseína y de soja. Mezclar e incubar. Tomar una asada del cultivo anterior y sembrar por estría cruzada en algunos de los siguientes medios: Agar sal manitol, Agar bair-parker o Agar Vogel Johnson, para el aislamiento de *Staphylococcus aureus* y el medio agar cetrimida para *Pseudomona sp.*

Incubar y observar la morfología colonial y compararla con las descritas en la tabla 6 y 7.

Si la morfología colonia y característica bioquímica no corresponde con la descrita en la tabla 6 y 7, se concluye que la muestra cumple con los requisito de ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Si la característica son similares realizar las siguientes pruebas:

Confirmación de *Staphylococcus aureus*.(USP36)

Prueba de coagulasa.

- Preparación de la muestra y pre-incubación.

Transferir una porción de la colonia sospechosa a caldo con hidrolizado de caseína y de soja e incubar 24 horas. Colocar 0.1 ml de cultivo en un tubo contenido 0.5ml de plasma fresco de conejo o caballo. Incubar a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y observar a las 3 horas y subsecuentemente por un periodo no mayor de 24 horas. Si durante este intervalo no se observa ningún grado de coagulación la muestra cumple con los requerimiento de ausencia de *Staphylococcus aureus*.

Para efectuar la prueba de caugulasa es necesario emplear control positivo y negativo.

Control positivo *Staphylococcus aureus* ATCC6538P

Control negativo *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228



Confirmación de *Pseudomonas aeruginosa*.

Producción de pigmentos

- Preparación de la muestra y pre-incubación.

Si en el medio agar cetrimide se encuentra colonias sospechosas de *Pseudomonas aeruginosa*, Observar las colonias a simple vista y con luz ultravioleta y compararla con la morfología colonial descrita en la tabla 6.

Si la morfología colonial de la tabla corresponde con la obtenida en los medios indicados efectuar la prueba de oxidasa.

Prueba de oxidasa

- Preparación y pre-incubación.

Impregnar una tira de papel filtro con una solución al 1% de diclorohidrato de N-Ndimetil p-fenilendiamina y colocar sobre ella una pequeña porción de la colonia sospechosa la prueba es positiva si se desarrolla un color púrpura en 10 segundos. Emplear como control positivo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC25619 y como control negativo *Escherichia Coli* ATCC10536

Si es necesario confirmar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* con pruebas bioquímicas adicionales.



Tabla N°6. Características de *staphylococcus aureus*.

Medio de cultivo	Morfología colonial	Morfología microscópica
Agar Vogel-Johnson	Colonias negras rodeadas de una zona amarilla	Cocos Gram positivos agrupados en racimos
Agar Sal Manitol	Colonias amarillas rodeadas de una zona amarilla	Cocos Gram positivos agrupados en racimos
<i>Agar Baird Parker</i>	Colonias negras lustrosas rodeadas de zonas claras	Cocos Gram positivos agrupados en racimos

Tabla N°7. Características de *Pseudomonas aeruginosa*

Medio de cultivo	Morfología colonial	Morfología microscópica	Prueba de oxidasa
Agar cetrimida	Colonias verdes azulosas, con luz ultravioleta se observan de color verdosos fluorescentes	Bacilos Gram negativos	Positiva
Agar pseudomonas para detección de fluoresceína	Colonias incoloras o amarillentas, con luz ultravioleta se observan de color amarillento fluorescente	Bacilos Gram negativos	Positiva
Agar para detección de piocianina	Colonias verde-azulosas, con luz ultravioleta se observan de color azul fluorescente	Bacilos Gram negativos	Positiva



Identificación de Salmonella y Eschirichia Coli

- Preparación y pre-incubación.

Inocular 10 ml o 10g de muestra en 90ml del medio caldo hidrolizado de caseína y de soja e incubar a 30-35°C durante 18-24 horas para enriquecimiento de salmonelas de Rappaport y Vassiliadis e incubar a 30-35°C durante 18-24 horas. Realizar subcultivos en placas de agar con xilosa, lisina y desoxilato (XLD). Incubar a 30-35°C durante 18-34 horas.

La posible presencia de salmonelas está indicada por el crecimiento de colonias rojas bien desarrolladas, con o sin centros negros, que se confirman por los ensayos de identificación. El producto satisface el ensayo si no se observa colonias de los tipos de descritos o si son negativos de confirmación de la identificación.

Aislamiento de Eschirichia Coli (USP36)

A partir del medio caldo digerido de caseína-Soja defenido por el proceso de validación. Incubar entre 30 y 35°C durante 18-24 horas. Finalizado el periodo de incubacion, aislar en Agar Mac Conkey. Incubar las placas entre 30 y 35°C durante 18 a 72 horas.

La presencia de E.Coli debe confirmarse utilizando pruebas bioquímicas adicionales.



Tabla N°8. Características morfológicas y bioquímicas de *Salmonella*

Medio de cultivo	Morfología colonial	Morfología microscópica
Agar verde brillante	Colonias pequeñas transparentes incoloras rosas o blancas opacas, frecuentemente rodeadas de una zona rosa o roja.	Bacilos Gram negativos
Agar Xilosa-Lisina Desoxicolato	Colonias que no modifican el medio, rojas con o sin centro negro.	Bacilos Gram negativos
Agar Sulfito de Bismuto	Colonias negras o verdes.	Bacilos Gram negativos
Agar Fierro Triple Azúcar	Superficie alcalina (roja) picadura acida (amarilla), con o sin producción de ácido sulfúrico (negro).	Bacilos Gram negativos

Tabla N°9. Características morfológicas y bioquímicas de *Escherichia coli*

Medio de cultivo	Morfología colonial	Morfología microscópica
Agar McConkey	Colonias grandes rosas-rojas rodeadas de una zona de precipitación	Bacilos Gram negativos
Agar Levine-Eosina-Azul de Metileno	Colonias pequeñas azul-negro con brillo metálico de color verde	Bacilos Gram negativos



DISEÑO METODOLOGICO



Tipo de estudio: El presente estudio es de tipo descriptivo, observacional. Los estudios observacionales (EO) corresponden a diseños de investigación cuyo objetivo es "la observación y registro" de acontecimientos sin intervenir en el curso natural de estos. A la vez es descriptivo, porque lo que se pretende es "describir y registrar" lo observado, como el comportamiento de una o más variables en un grupo de sujetos en un periodo de tiempo.

Área de estudio: El estudio se realizó en el laboratorio de microbiología de la carrera de farmacia, Facultad de Ciencias Químicas-UNAN-León.

Población de estudio: Pinturas labiales comercializadas en el mercado la terminal de la ciudad de león.

Muestra: La muestra consiste en cuatro marcas de pinturas labiales en barra, obteniéndose cuatro pinturas de cada marca, comercializadas en el mercado la terminal de la ciudad del león.

- **Marca #1 Wet M. Wild N°561**
- **Marca #2 Jordache N°025**
- **Marca #3 Magica (sin numeración).**
- **Marca #4 Yh. Bejar**

Muestreo: los productos fueron obtenidos a través de su compra en el mercado la terminal de la ciudad de león.

Tipo de muestreo: Es por conveniencia, ya que las muestras que participan en este estudio fueron elegidas por conveniencia del investigador para realizar este estudio.



Criterios de inclusión:

Que sean productos de venta libres.

Que los labiales sean comercializados en canastas del mercado de la “terminal León”.

Que los labiales se encuentren a intemperie.

Criterios de exclusión:

Que no sean productos de venta libre

Que los labiales sean comercializado en cualquier puesto de venta, excepto en canasta del mercado de la “Terminal León”.

Que los labiales no se encuentren a intemperie.

Fuentes de recolección de la información:

Fuente primaria

Se realizó una pequeña encuesta para conocer cuáles eran los labiales que más compraba la población. Esta pequeña encuesta fue realizada a los que se encontraban a cargo de la canasta de cosméticos.

Fuente secundaria.

- Información de sitios web. (internet).
- Revisión documental (libros, diccionarios, enciclopedias, tesis)

Variables de estudio:

- ✓ Recuentos de Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM).
- ✓ Recuento total de hongos y levaduras.
- ✓ Identificación de microorganismos patógenos objetables.



Tabla N°10.Materiales, equipos y reactivos.

Materiales	Equipos	Reactivos
Tubos de ensayos.	Mechero	Alcohol etílico al 70%
Algodón	Cocina.	Agua destilada.
Papel aluminio.	Horno.	Solución salina de NaCl.
Erlenmeyer.	Autoclave.	Tryptic soy Agar.
Probeta.	Incubadora.	Cetrimide Agar.
Placas Petri	Contador de colonias.	Baird Parker Agar.
Gradillas metálicas.	Balanza analítica.	Agar Sabouround Dextrosa
Asa de inoculación.	pH metro.	Yema de huevo.
Pipetas.		Selenite cystine broth
Beacker		Cepas
		<i>Staphylococcus aureus.</i>
		<i>Pseudomona aeruginisa.</i>
		<i>Escherichia coli.</i>
		<i>Salmonella spp.</i>
		Fosfato monobásico de potasio.
		Agar MacKonkey
		Agar Cetrimida
		CDCS



Tabla N°11.Operacionalizacion de la variable.

Variab	Conceptos	Indicador	Valor
Recuento de Bacterias Areobias Mesofilas (BAM)	El recuento de microorganismo Mesofilos aeróbicos, conocido también como recuento de placas aeróbicas (APC), es el método más usual para la estimación del número de microorganismo viables en productos de consumo humano.	(+) presencia (-) Ausencia	No > 100 ufc/g.
Recuento de hongos y levaduras.	Método que se basa en inocular una cantidad conocida de muestra, en un medio de cultivo selectivo específico, aprovechando la capacidad de este grupo microbiano de utilizar como nutrientes a los polisacáridos que contiene el medio.	(+) presencia (-) Ausencia	No > 100 ufc/g.
Identificación de microorganismos patógenos objetables.	Metodología precisa que permite la identificación de los microorganismos implicado en proceso de contaminación asociados a infecciones o de aquellos que tienen relación con el hombre.	(+) presencia (-) ausencia	Ausencia.



Procedimiento. Limite Microbiano.

Obtención de la muestras para el ensayo:

Las muestras utilizadas en este estudio las obtuvimos en el mercado “La Terminal”, de la ciudad de León, obteniendo 4 muestras de labiales en barra, compramos 4 de cada una de las muestras, obteniendo un total de 16 labiales.

Limite Microbiano.

Realizar la determinación en condiciones diseñadas para evitar la contaminación microbiana extrínseca del producto a examinar. Las precauciones a tomar para evitar contaminación deben ser tales que no afecten a ningún microorganismo que deba detectarse en la prueba.

Si el producto a examinar posee actividad antimicrobiana, esta debe eliminarse o neutralizarse en la medida de lo posible. Si se usan inactivadores para este fin, se debe demostrar su eficacia y la ausencia de toxicidad para los microorganismos.

Si se emplean sustancias tensioactivas en la preparación de la muestra, se debe demostrar la ausencia de toxicidad para los microorganismos y su compatibilidad con cualquier inactivador usado.

Promoción del crecimiento de los medios.

Analizar cada partida de medio listo para usar y cada partida de medio preparado a partir de medio deshidratado o de los ingredientes indicados.

Inocular porciones/placas de Caldo Digerido de Caseína y Soja y Agar Digerido de Caseína y Soja con un número pequeño (no más de 100ufc) de los microorganismos indicados. Empleando una porción/placa individual del medio para cada uno. Inocular placas de Agar



Saboraand Dextrosa con un número pequeño (no más de 100 ufc) de los microorganismos indicadores, empleando una placa individual de medio para cada uno e inocular.

Para medios sólidos, el crecimiento no debe diferir en un factor mayor de 2 a partir del valor calculando para un inculo estandarizados. Para un inculo recién preparado, se produce un crecimiento de microorganismo comparable al obtenido anteriormente con una partida de medio analizada y aprobada previamente. Los medios líquidos son adecuados si se produce un crecimiento claramente visible de microorganismos comparable al obtenido anteriormente con una partida de medio analizado y aprobada previamente.

Preparación del medio

- Según la USP36, se tomaron 1.25ml para 1000 ml de solución de fosfato Monobásico a pH 7, en 400 ml de agua destilada, para un total de 0.5ml de la solución saturada.
- Se tomaron 0.5ml de la solución saturada de fosfato, y se le agregaron 4g de solución tensioactiva de tween 80.
- Se distribuyeron a 4 botellas de 90ml de Caldo Digerido de Caseina de soja, esteril a 121°C durante 15 minutos.

RECUENTO DE ORGANISMO MESOFILICOS AEROBICOS.

Para el recuento de organismos Mesofílicos aeróbicos (BAM), existen dos métodos:

- ✓ Método en placa.
- ✓ Método en tubo (NMP).

Realizando el estudio, con el primer método.



PROCEDIMIENTO METODO EN PLACA.

Se efectuaron las diluciones decimales necesarias para que 1ml. Contenga entre 10 y 100 UFC/ml.

- Realizando todo este procedimiento en el cuarto de siembra, ya que todo los materiales están completamente estériles.
- Se preparó un pool de cada una de las muestras en estudio, que consistió en tomar 3.5g de cada pintura labial en barra, hasta obtener un total de 10g de la misma, luego se llevaron a un Erlenmeyer que contenía la solución del medio.
- Se pipeteó 1ml de la solución, y se transfirieron a dos placas petric estériles, agregándole inmediatamente a cada placa de 15 a 18ml de Agar DCS previamente fundido y enfriado a una temperatura de aproximadamente de 45°C, hay que recalcar que al abrir y cerrar las placas petric después de agregarle el Agar DCS se flamea.
- Se rotularon las placas petric como 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} para que 1 ml permita obtener entre 30 a 300 colonias, de la misma forma se realizó el mismo procedimiento para las distintas diluciones, de las demás muestras.
- Mezclamos las muestras rotando las placas (técnica del ocho), sobre una superficie plana y encubamos de 24 a 48 horas a 37°C.
- Una vez que pasa el tiempo estableció por la USP36, examinamos las placas para verificar el crecimiento de microorganismos.
- Con un cuenta colonias, contamos el número de colonias y expresamos el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismo por g (UFC/g) de muestra.

Criterio de aceptación.

El cosmético se acepta si se observan UFC en cantidades menores de 100 UFC/g o ml de muestra en la dilución 1:10 y los resultados se expresan: Menos de 100 UFC/g o ml de muestra.



RECUESTO DE HONGOS Y LEVADURAS.

- Se realiza el mismo procedimiento anterior de Recuento de Organismo Mesofilos Aerobios, con la diferencia que se utiliza el medio Agar Dextrosa-Saboraund y se le agrega de 15 a 18 ml del mismo, se procede a encubar de 5 a 7 dias a 37°C.
- Con un cuenta colonias, contamos el número de colonias y expresamos el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismo por g (UFC/g) de muestra.

Una vez terminada el recuento de hongos y levaduras, en dos caja petric estériles, se rotulan como Control del Medio Extremo (CME) y Control del Medio Ambiente (CMA), del cual al CMA se deja abrir la caja petric durante 1 minuto y la caja petric del CME permanece cerrada, esto es para determinar presencia de crecimiento de microorganismo en el ambiente del cuarto de siembra.

Determinación de Microorganismo Patógenos Objetables.

- Se preparó un pool estéril de cada una de las muestras en estudio, que consistió en tomar 3.5g de cada pintura labial en barra, hasta obtener un total de 10g de la misma, luego se llevaron a un Erlenmeyer que contenía 90ml de CDS e incubar de 35 a 37°C durante 48 a 72 horas.

Para determinar presencia de Salmonella.

- Del Erlenmeyer que tenemos, tomamos 1 ml y lo añadimos a 1 tubo de ensayo que contiene 9ml de Caldo Selenito Cisteine, mezclamos e incubamos de 18 a 24 horas a 37°C .
- Una vez encubado con un asa de inoculación se toma muestra al tubo de ensayo y se realiza una resiembra, en una caja petric que contiene Agar XLD (Xilosa-Lisine-Dexosicolato).
- Invertir el plato e incubar de 35 a 37°C, durante 48 a 72 horas.



- Al examinar los platos si presenta colonias Gram negativas, de color rojo intenso con o sin centros negros este no satisface el ensayo y por ende está en presencia de **Salmonella.**

Para determinar presencia de Staphylococcus aureus.

- Del Erlenmeyer, se toma la muestra con un asa de inoculación por medio de estria cruzada, se realiza en una placa petric que contiene Agar Bair Parker, encubamos los platos en posición invertidas de 35 a 37°C durante 24 a 48 horas.

Interpretación de los resultados.

La ausencia de crecimiento de microorganismo indica que el producto satisface el ensayo. La aparición de colonias negras de cocos Gram positivos agrupados en forma de racimos de uva rodeada de una zona clara, puede constituir un indicio de presencia de **Staphylococcus aureus.**

Para confirmar la presencia de **Staphylococcus aureus** se realiza la prueba de la coagulasa, si el resultado de la prueba es positivo el producto no satisface el ensayo. Si el resultado es negativo, el producto satisface el ensayo.

Prueba de la coagulasa:

- En un tubo de ensayo, se le agrega 9 ml de Caldo BHI y se siembra con el **Staphylococcus** sospechoso, se encuba a 37°C durante 6 horas, si el tubo forma un coagulo o produce una trama roja de fibrina el resultado de la prueba es positivo. Si el tubo de ensayo no contiene ningún coagulo, en otro tubo de ensayo se agrega 3 ml de plasma de conejo y de igual forma se siembra con el **Staphylococcus** sospechoso, se encuba a 37°C durante 2 horas, si el tubo no presenta ninguna coagulación se deja encubar 2 horas más hasta un límite de 24 horas, hasta que el tubo presente coagulación, una vez que el tubo presenta coagulación si es de color



blanco hueso, está en presencia de *Staphylococcus epidermide*, si da un color amarillo dorado esta en presencia de *Staphylococcus aureus*.

Determinar presencia de *Pseudomona aeruginosa*.

- Del Erlenmeyer, se toma la muestra con un asa de inoculación por medio de estría cruzada, se realiza en una placa petric que contiene Agar Cetrimide, encubamos los platos en posición invertidas de 35 a 37°C durante 24 a 48 horas.

Interpretación de los resultados.

Si al examinar los platos. No contiene colonias Gram negativas de color verde musgo, este satisface el ensayo, si contiene colonias Gram negativas este no satisface el ensayo.

Determinar presencia de *Escherichia coli*.

- Del Erlenmeyer, se toma la muestra con un asa de inoculación por medio de estría cruzada, se realiza en una placa petric que contiene Agar Mac Conkey, encubamos los platos en posición invertidas de 35 a 37°C durante 24 a 48 horas.

Interpretación de los resultados.

Si al examinar los platos estos presenta colonias grandes de color rosado chicha integrada por bacilos Gram negativos, indica la probable presencia de *Escherichia coli*.



Resultados y análisis de resultados



Para la realización de los análisis limpiamos cada uno de los labiales con alcohol al 70° y algodón, para después marcarlos de la siguiente manera:

Tabla N°12. Muestra asignadas a cada una de las marcas labiales.

Muestra	Marca de labiales.
Muestra #1	Wet M. Wild N°561
Muestra #2	Jordache N°025
Muestra #3	Magica (sin numeración)
Muestra #4	Yh. Bejar.

Tabla N°13. Tiempo, temperatura y tipo de siembra de microorganismos analizados.

Microorganismo	Temperatura °C	Tiempo	Siembra
Bacterias aerobias Mesófilas	35 – 37 °C	24 – 48hrs/ Oscuridad	Superficie
Hongos y Levaduras	20 – 25 °C	7 días / Oscuridad	Superficie
<u><i>Pseudomona aeuroginosa</i></u>	35 – 37 °C	48 – 72 hrs.	Superficie
<u><i>Staphylococcus spp.</i></u>	35 – 37 °C	48 – 72 hrs.	Superficie
<u><i>Escherichia coli</i></u>	35 – 37 °C	48 – 72 hrs.	Superficie
<u><i>Salmonella.</i></u>	35 – 37 °C	48 – 72 hrs.	Superficie



Después del periodo de incubación correspondiente, se realizó la lectura de resultados. La Tabla N°14, describe la interpretación de resultados y características de las colonias para las pruebas de recuento de mohos y levaduras, y el recuento total de Mesófilos Aerobios. Además de la interpretación de resultados y características de las colonias para las pruebas de identificación de patógenos.

Tabla N°14 Tabla de interpretación de resultados y características de las colonias para las pruebas de recuento de BAM, hongos y Levaduras y microorganismos patógenos

Microorganismo	Medio de Cultivo	Gram.	Características de las colonias	Interpretación
BAM	Agar Digerido Caseína y Soya		Recuento total (todo tipo de colonia)	Acceptable: $\leq 10 \times 10^1$ UFC/g ó mL No Acceptable: $> 10 \times 10^1$ UFC/g ó mL
Hongos y Levaduras	Agar Sabouroud		Levaduras: colonias convexas Mohos: Colonias filamentosas	Acceptable: $\leq 10 \times 10^1$ UFC/g ó mL No Acceptable: $> 10 \times 10^1$ UFC/g ó mL
<i>Staphylococcus sp.</i>	Agar Bair Parker	Bacilos Gram (+).	Colonias amarillas para St. Aureus. Colonias blanco hueso para St. epidermides.	Acceptable: Ausencia No acceptable: Presencia
<i>Pseudomona aeuroginosa</i>	Agar Cetrimide	Bacilo Gram (-)	Colonias amarillas verdosas (verde musgo) ó pardo rojizas.	Acceptable: Ausencia No acceptable: Presencia
<i>Escherichia coli</i>	Agar MacConkey	Bacilo Gram (-)	Colonias rosadas, chichas, de tamaño grande.	Acceptable: Ausencia No acceptable: Presencia
<i>Salmonella.</i>	Agar selinite.	Bacilos Gram (-)	colonias rojas intensas con o sin centros de color negro	Acceptable: Ausencia. No acceptable: Presencia



Tabla N°15. Resultados de Mesófilos aerobios, Mohos y Levaduras de las muestras analizadas

	Muestra # 1		Muestra # 2		Muestra #3		Muestra # 4	
	24 horas	48 horas						
Bacterias Aerobias Mesófilas	< 100 UFC/g	≤100U FC/g	< 100 UFC/g	≤100U FC/g	< 100 UFC/g	≤100 UFC/g	< 100 UFC/g	≤100UF C/g
	Muestra # 1		Muestra # 2		Muestra #3		Muestra # 4	
	5 días	7 días						
Mohos y Levaduras	≤10 ufc/g	≤10 ufc/g						

Análisis de resultados:

En relación al crecimiento de Bacteria Aerobias Mesófilas, después de las 24 hrs. y 48 hrs. de incubación no se encontró crecimiento en las muestras, así mismo en el recuento combinado de Hongos y Levaduras a los 5 y 7 días de incubación de las mismas no presentaron crecimiento por lo tanto, estas muestras son aptas para su aplicación de acuerdo con los criterios establecidos en el RTCA 71.03.45:07 y la USP 36.

Cabe recalcar que los controles del medio ambiente y del medio externo, no se le encontró crecimiento de ninguna bacteria, por lo que está ausente de Microorganismo patógenos.



Tabla N°16. Resultados de patógenos

Microorganismos	Muestra # 1		Muestra # 2		Muestra #3		Muestra # 4	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
<i>Staphylococcus spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Presencia de Crecimiento

- Ausencia de Crecimiento

Análisis de resultados:

Para la identificación de las bacterias patógenas, se tomaron en cuenta, las características de crecimiento en cuanto a su forma, superficie, borde, color, aspecto, elevación y posibles cambios en el medio de cultivo en cada una de las bacterias en estudio.

En nuestro estudio no se evidenció crecimiento de ninguna bacteria objetable, por lo tanto podemos expresar que las muestras analizadas cumplen con los parámetros establecidos en cuanto a la presencia de Bacterias Aerobias Mesófilas, Hongos y Levaduras, así como también no se presentó presencia de crecimiento de *Staphylococcus spp., Pseudomona aeruginosa, Escherichia coli y Salmonella.* Por lo tanto las muestras analizadas cumplen con los parámetros establecidos según la RTCA y la USP 36.



Conclusión.

Las pinturas labiales de las marcas **Wet M. Wil N°561**, **Jordache N°025**, **Mágica** (sin numeración) y **Yh Bejar**. Comercializadas en el mercado la “terminal” de la ciudad de león, con respecto a las características organolépticas como olor, aspecto y adherencia, presentaron resultados aceptables, sin embargo la pintura Mágica (sin numeración) su empaque primario se presentó borrosa.

Según los resultados obtenidos en las distintas pruebas para bacterias aerobias mesofilas, hongos y levaduras y microorganismos objetables, las pinturas labiales usadas en este estudio cumplen con la especificación demostrados en el RTCA 71.03.45:07 para cosmético y según la USP 36 por lo tanto no perjudica la salud de la población.

Al realizar estos tipos de estudios para detectar alguna presencia de bacterias patógenas podemos prevenir enfermedades patológicas que son comunes en algunas personas con productos comercializados en los mercados.

Los resultados obtenidos en nuestros estudios garantizan la confiabilidad del producto ya que cumplen con todo los parámetros establecidos según USP36 y RTCA 71.03.45:07.



Recomendación

A la facultad de Ciencias Químicas:

- ❖ Que realicen más estudios microbiológicos en productos cosméticos ya que son productos que la mayoría de las personas en especial las mujeres, utilizan para su piel, para garantizar un producto eficaz, seguro y confiable.
- ❖ Que den a conocer los resultados de los estudios monográficos a los estudiantes que realizan investigación de dicho tema, ya que no se cuentan con este tipo de estudio.

A los estudiantes:

- ❖ Que se interesen más en las competencias necesarias sobre la importancia de la evaluación microbiológica que deben de tener los productos cosméticos, ya que son de mucha importancia para la población.



Bibliografía

J.B Wilkinso-R. J.Moore COSMETOLOGIA DE HARRY Traducido por Marta Rodríguez Navarro. Licenciada en farmacia Darío Rodríguez Devesa doctor en química industrial. EDICIONES DIAZ DE SANTOS S.A.1990

https://www.search?source=hp&ei=8NYRXNmaH46p5wL9zrNg&q=J.B+Wilkinso-R.+J.Moore++COSMETOLOGIA+DE+HARRY+&btnK=Buscar+con+Google&oq=J.B+Wilkinso-R.+J.Moore++COSMETOLOGIA+DE+HARRY+&gs_l=psy-ab.3...2458.2458..3344...0.0..0.346.918.2-2j1.....0....1j2..gws-wiz.....0.nhAbkIXWoDc

Castellano, P.M. (2010). Control de calidad en la Industria Farmacéutica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmaceuticas. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

Revisado: Julio 2016, Disponible en: Http://www.fbioyf.unr.edu.ar/rrii/varios/pdf2010sharapin/sharapin2010_castellano.pdf

Bomblies, L.; WeiB, C. and Beckmann, G. (2007)Examination of Microbiological Quality of Pharmaceutical Raw Materials. Pharmeuropa Scientific notes 2007-1; 1-7. Revisado:

Julio 2016 Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/5853896_Examinationofmicrobiologicalqualityofpharmaceuticalrawmaterials

Cerra, H. Fernandez M.C. et al.(2010) Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéuticas, cosmética y de productos médicos. Revisado: Mayo 2016. Disponible en:

<http://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>



Cerra, H. Fernandez M.C. et al.(2010) Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéuticas, cosmética y de productos médicos. Revisado: Mayo 2016. Disponible en: <http://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>

Pollack, M.(1990). Pseudomonas aeruginosa, p. 1673-1691. In Principles and Practice of Infections Diseases. G.L. Mandell, R.G.Douglas Jr., and J.E. Bennett (ed) 3rd ed. Churchill Livingstone, New York. Revisado: Octubre 2016. Disponible en: https://books.google.com.ni/books?id=KDv2BwAAQBAJ&pg=PA216&1pg=PA216&dq=Pollack,+M.+1990.+Pseudomonas+aeruginosa,&source=bl&ots=55GKkjY3sD&sig=vOwzAJdJLT5R0JCFODRH7LBd1w&h1=es419&sa=X&ved=0ahUKEwiulMqMp_TPAhXIWT4KHVe6B1wQ6AEIPDAD#v=onepage&q=Pollack%2C%20M.%201990.%20Pseudomonas%20aeruginosa%2C&f=false

Holder, I.A. (1993). Pseudomonas aeruginosa burn infections: pathogenesis and treatment, p. 275-295. In M. Campa, M. Bendinelli, and H. Friedman (ed), Pseudomonas aeruginosa as an opportunistic pathogen. Plenum Press, New York, N.Y. Revisado: Julio 2016
Disponible en: https://www.google.com.ni/imgre?imgurl=http://t2.gstatic.com/images%3Fq%3Dtn:ANd9GcRKxvflo1_BXLDVs7Xt06hR85DeC_1TX2u3thyR9RzsTwPbyq2&imgrefurl=http://books.google.com/books/about/Pseudomonas_Aeruginosa_as_an_Opportunist.htm%3Fid%3DKDv2BwAAQBAJ%26source%3Dkp_cover&h=1080&w=716&tbnid=cnee1Jzyd1gHCM:&tbnh=160&docid=NxrKdtHvMbccNM&itg=1&usg=viLwK7zdvU_Me4RokoO_mP17Jz8=&sa=X&ved=0ahUKEwoSqISSqfTPAhVFeD4KHZvABJIQ_B0IkAEwCg

Pollack, M.(1990). Pseudomonas aeruginosa, p. 1673-1691. In Principles and Practice of Infections Diseases. G.L. Mandell, R.G.Douglas Jr., and J.E. Bennett (ed) 3rd ed. Churchill Livingstone, New York. Revisado: Octubre 2016. Disponible en:



https://books.google.com.ni/books?id=KDv2BwAAQBAJ&pg=PA216&1pg=PA216&dq=Pollack,+M.+1990.+Pseudomonas+aeruginosa,&source=bl&ots=55GKkjY3sD&sig=vOwzAJdJLT5R0JCFODRH7LBd1w&h1=es419&sa=X&ved=0ahUKEwiulMqMp_TPAhXIWT4KHVe6B1wQ6AEIPDAD#v=onepage&q=Pollack%2C%20M.%201990.%20Pseudomonas%20aeruginosa%2C&f=false

Holland, S.P., Pulido J.S., Shires T.K., and Costerton J.W.1993. *Pseudomonas aeruginosa* ocular infections, p 159-176. In *Pseudomonas aeruginosa: the Opportunist*. R.B. Fick Jr. (ed), CrC Press, Inc., Boca Raton, Fla. Revisado: Julio 2016. Disponible en: https://www.google.com.ni/imgres?imgurl=http://t2.gstatic.com/images%3Fq%3Dtn:AND9GcRKxvflol_BXLDVs7Xt06hR85DeC_1TX2u3thyr9rzsTwPbyq2&imgrefurl=http://books.google.com/books/about/pseudomonas_Aeruginosa_as_an_Opportunist.html%3Fid%3DKDv2BwAAQBAJ%26source%3Dkp_cover&h=1080&w=716&tbnid=cnee1JzydlgHCM:&tbnh=106&docid=NxrKdtHvMbccNM&itg=1&usq=viLwK7zdvU_Me4RokoO_mP17Jz8=&sa=X&ved=0ahUKEwSqISSqfTPAhVFeD4KHZvABJIQ_B0IkAEwCg

Pollack, M.(1990). *Pseudomonas aeruginosa*, p. 1673-1691. In *Principles and Practice of Infections Diseases*. G.L. Mandell, R.G.Douglas Jr., and J.E. Bennett (ed) 3rd ed. Churchill Livingstone, New York. Revisado: Octubre 2016. Disponible en: https://books.google.com.ni/books?id=KDv2BwAAQBAJ&pg=PA216&1pg=PA216&dq=Pollack,+M.+1990.+Pseudomonas+aeruginosa,&source=bl&ots=55GKkjY3sD&sig=vOwzAJdJLT5R0JCFODRH7LBd1w&h1=es419&sa=X&ved=0ahUKEwiulMqMp_TPAhXIWT4KHVe6B1wQ6AEIPDAD#v=onepage&q=Pollack%2C%20M.%201990.%20Pseudomonas%20aeruginosa%2C&f=false

Cerra, H. Fernandez M.C. et al.(2010) *Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéuticas, cosmética y de productos médicos*. Revisado: Mayo 2016. Disponible en: <http://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>



Wesley E. Kloods and Tammy L. Bannerman, (2005). Staphylococcus and Micrococcus. Chapter 22. P. 282-293. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, 1325 Massachusetts Avenue N.W Washington DC. Revisado: Julio 2016. Disponible en: <https://ic.ucsc.edu/~saltikov/bio1191/readings/prokaryotes/Staphylococcus.pdf>

Cerra, H. Fernandez M.C. et al.(2010) Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéuticas, cosmética y de productos médicos. Revisado: Mayo 2016. Disponible en: <http://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>

Abad Lopez, M. Diaz Sanchez, D. Sanchez Bustamante, E. Silva Lopez, J. Vega Torrez, M. (2016). Examen microbiológico y reporte de control microbiológico de productos farmacéuticos. Universidad de WIENER. Lima, Peru. Revisado: Julio 2016. Disponible en: http://www.slideshare.net/josuesilva526/examen-microbiologico-y-reporte-de-control-microbiologico-de-producto-farmaceuticos-no-esteriles?from_action=save

Universidad de San Carlos de Guatemala facultad de ciencias químicas y farmacia. “Evaluación de la calidad microbiológica de cosméticos para bebes elaborados por la industria guatemalteca” Ligia María Guerra Bone. Octubre. 2003. http://www.google.com.ni/search?ei=If3uW7bILYzYzwLypaJg&q=“Evaluación+de+la+calidad+microbiológica+de+cosméticos+para+bebes+elaborados+por+la+industria+guatemalteca”+pdf&oq=“Evaluación+de+la+calidad+microbiológica+de+cosméticos+para+bebes+elaborados+por+la+industria+guatemalteca”+pdf&gs_l=psy-ab.3...26367.28004..28929...0.0..0.0.....4....1..gws-wiz. 4uSg6i9sFM

Universidad Nacional De Trujillo, Facultad de farmacia y bioquímica. Escuela académico profesional de farmacia y bioquímica. “Calidad De Rubores Cosméticos Comercializados



En Emporio Albarracín, Trujillo-2016” Melissa I. Cruz Flores. Carol Pamela García. CH. Trujillo-Perú 2017. <https://docplayer.es/75990959-Universidad-nacional-de-trujillo-facultad-de-farmacia-y-bioquimica-escuela-academico-profesional-de-farmacia-y-bioquimica.html>

Recomendaciones para el desarrollo de ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE PRODUCTOS COSMETICOS, Juan Pablo Díaz Castillo, 2018. [https://www.invima.gov.co/images/pdf/Prensa/publicaciones/cosmeticos_aseo/ONUD I Guia-de-Estabilidad FINAL.pdf](https://www.invima.gov.co/images/pdf/Prensa/publicaciones/cosmeticos_aseo/ONUD_I_Guia-de-Estabilidad_FINAL.pdf)

Barrate Echeverria Rodrigo. Investigación: un camino al conocimiento un enfoque cualitativo y cuantitativo/ --6 .riemp de la 1 era ed. San jose C.R: EUNED, 2002, 280 pag.; 27cm https://www.search?ei=-dYRXIvhHJCv5wKqk5-IDQ&q=Investigación%3A+un+camino+al+conocimiento+un+enfoque+cualitativo+y+cuantitativo&oq=Investigación%3A+un+camino+al+conocimiento+un+enfoque+cualitativo+y+cuantitativo&gs_l=psy-ab.3..0j0i22i30.109877.112362..113382...0.0..3.264.964.0j5j1.....0....1j2..gws-wiz.....0..0i71j33i10i21j33i10i160.xfK5nga_Q8Y



ANEXOS.

Anexo N°1

SOLUCIONES.

1. Solución reguladora de fosfato Ph 7.2

Solución concentrada.

Fosfato monobásico de potasio 34.0g

Agua destilada 500ml.

En un matraz volumétrico de 1000ml, disolver el fosfato en el agua y ajustar el ph a 7.2 ± 0.1 con una solución de hidróxido de sodio 1 N (aproximadamente 175ml) llevar a volumen y mezclar.

Envasar en recipientes adecuados y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Almacenar en refrigeración.

Solución diluida.

Diluir 1.25 ml de la solución concentrada en 1000ml de agua destilada. Envasar en volumen de 90 y 9 ml y esterilizar por calor húmedo a 121°C durante 15 minutos.

2. Solución salina.

Cloruro de sodio 8.5 g

Agua destilada 1000ml



Disolver el cloruro en el agua, envasar en recipientes adecuados y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Formulación se indique otras condiciones.

Anexos N°2

MEDIOS:

I. CALDO DIGERIDO DE CASEINA/SOYA/LECITINA/POLISORBATO

20

Digerido pancreático de caseína 20.0g

Lecitina de soya 5.0g

Polisorbato 20 40ml

Agua destilada 960ml

Ph después de esterilizar 7.0 ± 0.2

Disolver el digerido pancreático de caseína y la lecitina de soya en agua calentar de 48°C a 50°C BM por 30 minutos aproximadamente. Adicionar el polisorbato 20 mezclar y esterilizar.

II. AGAR SAL MANITOL

Digerido pancreático de caseína 5.0g

Digerido péptico de tejido animal 5.0g

Extracto de carne 1.0g

D-manitol 10.0g

Cloruro de sodio 75.0g

Agar 15.0g

Rojo de fenol. 0.025g

Agua destilada 1000ml

Ph después de esterilizar 7.4 ± 0.2



III. AGAR BAIRD-PARKER-MEDIO BASE

Digerido pancreático de caseína	10.0g
Extracto de carne	5.0g
Extracto de levadura	1.0g
Cloruro de litio	5.0g
Agar	20.0g
Glicina	12.0g
Pirubato de sodio	10.0g
Agua destilada	950ml

Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar con agitación constante y hervir durante 1 minuto esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

pH después de esterilizar 6.8 ± 0.2 .

Después de esterilizar enfriar el medio entre 45 y 50°C. Agregar 10ml de solución estéril 1:100 de terulito de potasio y 50 ml de emulsión de yema de huevo, mezcla suavemente.

Preparación de la emulsión de la yema de huevo.

Desinfectar el cascaron de los huevos con solución de tintura de yodo al 2.0%, romperlos y separar en condiciones asépticas las yemas en una probeta esteril, añadir solución salina en una proporción de 3 a 7 (yema de huevo/ solución salina). Homogeneizar. El medio base estéril puede conservarse en refrigeración.

El medio de cultivo completo debe emplearse dentro de las 24horas siguientes a su preparación.



IV. AGAR CETRIMIDE.

Digerido pancreático de gelatina	20.0g
Cloruro de magnesio	1.4g
Sulfato de potasio	10.0g
Agar	13.6g
Bromuro de cetil trimetilamonio (cetrimida)	
Glicerol	0.3g
Agua destilada	1000ml
Ph después de esterilizar	7.2±0.2

Disolver en el agua los componentes sólidos, adicionar el glicerol. Calentar a ebullición con agitación constante durante 1 minuto.

V. CALDO SELENITO-CISTINA.

Digerido pancreático de caseína	5.0g
Lactosa	4.0g
Fosfato de sodio	10.0g
Selenito acido de sodio.	4.0g
L-cistina	0.01g
Agua destilada	1000ml
Ph final	7.0±0.2

Calentar por medio de una corriente de vapor durante 15 minutos. No esterilizar.



VI. AGAR MAC.CONKEY

Digerido pancreático de gelatina	17.0g
Digerido pancreático de caseína	1.5g
Digerido péptico de tejido animal	1.5g
Lactosa	10.0g
Mezcla de sales biliares	1.5g
Cloruro de sodio	5.0g
Agar	13.5g
Rojo neutro	0.03g
Cristal violeta	0.03g
Agua destilada	1000ml
Ph después de esterilizar	7.1±0.2

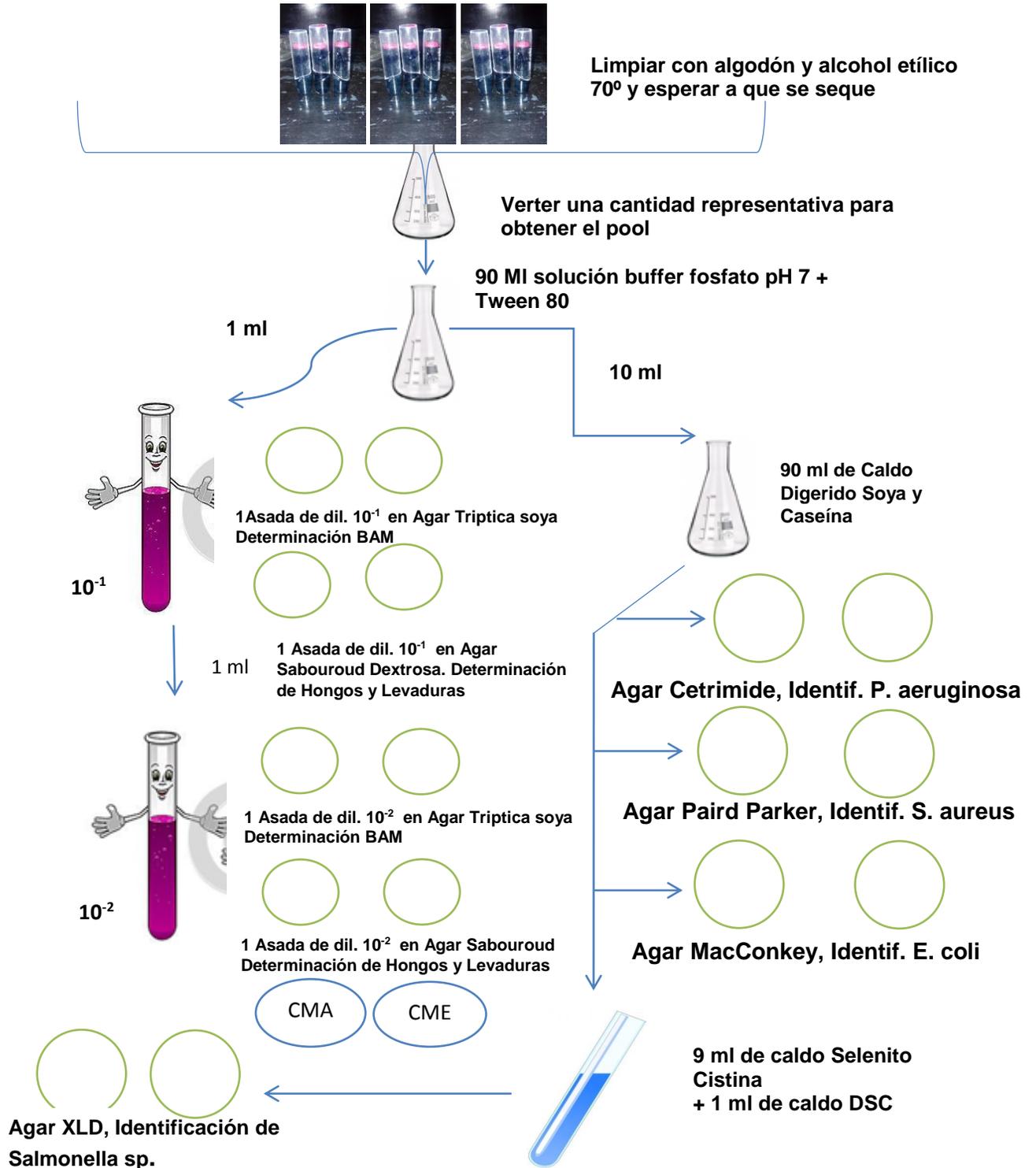
VII. AGAR DEXTROSA SABOURAUD

Dextrosa	40.0g
Digerido péptico de tejido animal	5.0g
Digerido pancreático de caseína	5.0g
Agar	15.0g
Agua destilada	1000ml
Ph después de esterilizar	5.6±0.2



Anexo N°3.

METODO LÍMITE MICROBIANO



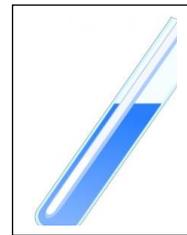


CONTINUACION.


**Agar Paired Parker, Identif.
Staphylococoos**

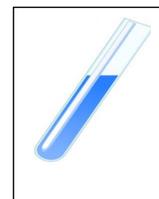
**Si da (+) la identificación de
Staphylococoos, se realiza la prueba
de coagulasa.**

**Prueba de coagulasa,
identificar 100% S.Aureus.**



**9 ml de caldo BHI
+ 1 ml de caldo DSC**

**Se realiza esta prueba con plasma de
conejo para identificar S.Epidermides.**



**Plasma de conejo +
3ml de la prueba de
cuagulasa**



