

RECUPERACIÓN DE *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y
Escherichia coli, USANDO AGUA PEPTONA Y CALDO LETHEEN EN
PRODUCTOS COSMÉTICOS DE LABORATORIOS LISSIA
BOGOTÁ- COLOMBIA

ENEIDA GALEANO LIZARAZO
Estudiante de Décimo Semestre
Programa de Microbiología

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
COLOMBIA
2017

RECUPERACIÓN DE *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y
Escherichia coli, USANDO AGUA PEPTONA Y CALDO LETHEEN EN
PRODUCTOS COSMÉTICOS DE LABORATORIOS LISSIA
BOGOTÁ- COLOMBIA

ENEIDA GALEANO LIZARAZO
Estudiante de Décimo Semestre
Programa de Microbiología

TRABAJO DE PASANTÍA
Presentado como requisito parcial para optar al título de
MICROBIÓLOGA

Asesora
Fanny Herrera Arias, Ph D

Asesora externa
María Fernanda Nieves
Químico farmacéutico

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
COLOMBIA
2017

Nota de aceptación

Firma Del Jurado

Firma Del Jurado

Pamplona, Julio del 2017

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por haberme permitido culminar con éxito esta etapa de mi vida, a mi mamita Flordelina Lizarazo por ser ese apoyo incondicional durante todo este camino, a mis hijos Danner Alejandro y Lina Valentina por ser la motivación día a día para seguir adelante, a mis familiares y amigos que con sus oraciones me apoyaron para cumplir esta meta propuesta.

Agradezco al Laboratorio Lissia por haber hecho posible la realización de este proyecto.

Especialmente a la Química Farmacéutica María Fernanda Nieves y al Microbiólogo Alberto Serrano, por su ayuda, dedicación e interés.

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN.....	12
1. OBJETIVOS.....	14
1.1. GENERAL	14
1.2. ESPECÍFICOS	14
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. MARCO REFERENCIA.....	16
3.1 BASES LEGALES.....	16
3.2 ANTECEDENTES.....	17
4. MARCO TEORICO.....	18
4.1 PRODUCTO COSMÉTICO	18
4.1.1 Características fisicoquímicas de productos cosméticos.....	18
4.1.1.1. Características fisicoquímicas de talcos.....	19
4.1.1.2. Características fisicoquímicas de jabón líquido.....	19
4.1.1.3. Características fisicoquímicas de crema Q10.....	20
4.1.2 Aseguramiento de la calidad de productos cosméticos	20
4.1.3 Conservantes en productos cosméticos	21
4.1.4 Diluyentes y Neutralizantes en la industria cosmética	22
4.2 Riesgos biológicos en la industria cosmética.....	23
4.2.1 Especificaciones microbiológicas y fisicoquímicas para productos cosméticos en Colombia (Resolución 1482).	24
(Resolución 1482).	24
4.2.2 Excepciones de análisis microbiológico, de acuerdo a condiciones desfavorables para el crecimiento de los microorganismos (Resolución 1482).	25
(Resolución 1482).	25
4.3 Antecedentes de productos cosméticos contaminados.....	25
5. METODOLOGÍA	27
5.1 PREPARACIÓN DE CEPAS, E IDENTIFICACIÓN DE LA DILUCIÓN	27
5.2 Selección y análisis microbiológico de las diferentes matrices.	28

5.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE LOS DILUYENTES EN PETRIFILM 3M Y RECuento EN PLACA.....	29
5.4 Actividades complementarias rutinarias descritas en el perfil del Analista de Control de Calidad con respecto al cargo por procedimientos internos basados en las NTC 4833 y USP NF 32 2014	29
5.4.1 Análisis microbiológico de materias primas, producto en proceso y producto terminado	30
5.4.2 Análisis microbiológico a superficies, equipos en planta, operarios, ambientes y aguas	31
6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	32
7. RESULTADOS	33
7.1 Confirmación de la viabilidad de las cepas ATCC.....	33
7.2 Determinación de la dilución para cada microorganismo.	34
7.3 Análisis microbiológicos a los productos jabón avena, crema Q 10 y talcos.....	34
7.4 Estimación de la capacidad neutralizante en la recuperación de las tres cepas inoculadas en talcos corporales.....	35
7.5 Estimación de la capacidad neutralizante en la recuperación de las tres cepas en crema para manos y cuerpo Q10.....	35
7.6 Estimación de la capacidad neutralizante en la recuperación de las tres cepas en jabón líquido avena.....	37
7.7. Resultados de actividades complementarias.....	38
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	49
9. CONCLUSIONES	56
10. RECOMENDACIONES.....	58
11. GLOSARIO.....	59
12. BIBLIOGRAFÍA.....	62
ANEXOS	66

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Secuencia de pasos para la preparación de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i> , en la identificación de la dilución.....	27
Figura 2. Procedimiento interno Laboratorio Lissia para el análisis microbiológico de las tres matrices.....	28
Figura 3. Secuencia de pasos para la estimación de la capacidad de los diluyentes en los dos métodos.....	29
Figura 4. Procedimiento interno Laboratorio Lissia para el análisis microbiológico de materia prima, producto en proceso y producto terminado.....	30
Figura 5. Procedimiento interno Laboratorio Lissia para el análisis microbiológico de operarios, áreas, superficies y aguas.....	31
Figura 6. Crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en medio Cetrimide, crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i> en medio Salado Manitol, crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en medio V.R.B.A.....	33

LISTA DE GRAFICAS

Pág.

Gráfica 1. Recuento de la evaluación del neutralizante en talcos corporales con <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i>	35
Gráfica 2: Recuento de la evaluación del neutralizante en crema para manos y cuerpo Q10 con <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i>	36
Gráfica 3: Recuento de la evaluación del neutralizante en jabón líquido avena con <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i>	37
Grafica 4. Resultados de análisis microbiológico (Aerobios mesófilos) de los diferentes puntos de aguas purificada en Laboratorios Lissia desde el mes de Febrero hasta Abril del 2017.....	39
Grafica 5. Resultados de análisis microbiológico (Levaduras) de los diferentes puntos de aguas purificada en Laboratorios Lissia desde el mes de Febrero hasta Abril del 2017.....	40
Gráfica 6. Recuento microbiológico de Aerobios mesófilos en las diferentes áreas de fabricación en Laboratorios Lissia desde el mes de Febrero hasta Abril del 2017.....	41

Gráfica 7. Recuento microbiológico de Mohos en las diferentes áreas de fabricación en Laboratorios Lissia desde el mes de Febrero hasta Abril del 2017.....	42
Gráfica 8. Recuento microbiológico de levaduras en las diferentes áreas de fabricación en Laboratorios Lissia de los meses Febrero hasta Abril del 2017.....	43
Gráfica 9. Resultados de análisis microbiológico para aerobios mesófilos de las diferentes superficies y equipos de fabricación en Laboratorios Lissia desde el mes de Febrero hasta Abril del 2017.....	44
Gráfica 10. Resultados de análisis microbiológico para Mohos de las diferentes superficies y equipos de fabricación en Laboratorios Lissia desde el mes de Febrero hasta Abril del 2017.....	45
Gráfica 11. Resultados de análisis microbiológico para Aerobios mesófilos de los operarios de fabricación en Laboratorios Lissia del mes de Febrero del 2017.....	46
Gráfica 12. Resultados de análisis microbiológico para de aerobios mesófilos de los operarios de fabricación en Laboratorios Lissia del mes de Marzo del 2017.....	47
Gráfica 13. Resultados de análisis microbiológico para de aerobios mesófilos de los operarios de fabricación en Laboratorios Lissia del mes de Abril del 2017.....	48

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Cronograma de actividades.....	32
Tabla 2. Descripción macroscópica y microscópica de las cepas ATCC.....	33
Tabla 3. Tiempo de incubación y dilución, para cada uno de los microorganismos.....	34
Tabla 4. Resultados de análisis microbiológico de los diferentes puntos de aguas potable en Laboratorios Lissia desde el mes de Febrero hasta Abril del 2017.....	38

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Certificado microbiológico de talco corporal x 300 g.....	66
Anexo 2. Certificado microbiológico de jabón líquido avena x 500 mL.....	67
Anexo 3. Certificado microbiológico crema Q10 x 1000 mL.....	68
Anexo 4. Certificado Fisicoquímico de talcos corporales x 300 g.....	69
Anexo 5. Certificado Fisicoquímico de jabón líquido avena x 500 mL.....	70
Anexo 6. Certificado Fisicoquímico crema Q10 para manos y cuerpo x 1000 mL.....	71
Anexo 7 Certificado de ONUDI.....	72
Anexo 8 Certificado 3M Petrifilm.....	73

INTRODUCCIÓN

Los cosméticos son productos destinados para ser aplicados al cuerpo humano ya sea para limpiar, embellecer o resaltar la apariencia sin afectar la piel.

En la industria cosmética resulta de suma importancia la evaluación de los procedimientos de fabricación y el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura para la obtención de productos seguros, eficaces, estables y de calidad, siendo relevantes en este último aspecto el control microbiológico el cual garantice durante toda su vida útil su inocuidad. Los productos cosméticos no son estériles y son susceptibles a contaminación debido a su composición la cual incluye en la mayoría de ellos un alto porcentaje de agua, extractos vegetales y/o animales, los cuales si no son controlados pueden alterar las características organolépticas del producto final e inclusive afectar la seguridad del consumidor. **ANVISA, (2004).**

Es responsabilidad del fabricante que los productos cosméticos estén dentro de los límites permitidos por la normativa vigente durante todo el tiempo de vida útil, por lo cual los productos no estériles son conservados con sustancias químicas que son necesarias para la conservación adecuada de las formulaciones. La calidad microbiológica de un producto es un indicativo del cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura, las cuales contemplan ámbitos de higiene, controles en procesos, operarios, ambientes, equipos, utensilios, sistemas de apoyo críticos (aires y agua) e instalaciones. **ANVISA, (2004).**

Los conservantes son sustancias químicas adicionadas a los productos cosméticos, para prevenir el desarrollo de microorganismos (bacterias, mohos y levaduras) que se introducen sin ser indicados durante el proceso de fabricación o después de éste. **ANVISA, (2004).**

En un análisis microbiológico a productos cosméticos los neutralizantes son los encargados en los diluyentes de anular los agentes antimicrobianos presentes en un producto; estos no deben ser tóxicos para los microorganismos. **García (2015)**.

La Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 37 capítulo 61) recomienda neutralizar el conservante de un producto para determinar la carga real de microorganismos presentes en el producto final y permitir así su recuperación. El presente trabajo consistió en comparar dos diluyentes con composiciones diferentes, para ello se inocularon tres microorganismos ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Escherichia coli***, con el fin de determinar en cuál de ellos se obtenía mayor recuperación.

1. OBJETIVOS

1.1. GENERAL

Recuperar *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, usando agua Peptona y caldo Letheen en productos cosméticos fabricados en Laboratorios Lissia.

1.2. ESPECÍFICOS

- Evaluar el comportamiento de los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, en las diferentes matrices cosméticas jabón líquido avena, crema para manos y cuerpo Q10 y talcos corporales.
- Comparar el porcentaje de recuperación de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, en las diferentes matrices con relación al caldo Letheen y agua Peptona, manejando el método de siembra en Petrifilm 3M y siembra en profundidad, mediante gráficas en Microsoft Excel 2010.

2. JUSTIFICACIÓN

En la industria cosmética la calidad sanitaria de un producto durante toda su vida útil es de vital importancia, ya que los productos cosméticos no son estériles y son susceptibles a contaminación por su elevado porcentaje de agua. Muchas sustancias utilizadas en su fabricación pueden ser degradadas biológicamente por microorganismos y son productos que se deterioran con el paso del tiempo. La utilización de sustancias químicas con actividad antimicrobiana que son incorporadas durante su fabricación, tiene como fin prevenir a los productos frente a la contaminación microbiana durante la fabricación, almacenaje y uso cotidiano del consumidor, pero nunca deben utilizarse para destruir los microorganismos de productos cosméticos contaminados **USP NF 32 (2014)**.

En los análisis microbiológicos para los productos cosméticos la utilización de neutralizantes en los diluyentes es de relevancia microbiológica, se recomienda neutralizar al conservante el cuál puede estar enmascarando una carga microbiana que no se puede detectar si solo se utiliza un diluyente, el uso en esta investigación de dos diluyentes con constituciones diferentes, uno con neutralizante como el Caldo Letheen y otro sin neutralizante como el Agua Peptona, permitirá determinar cuál de los dos ofrece una mayor recuperación microbiana. Es crucial para Laboratorios Lissia estipular cuál de los dos diluyentes permite una mayor recuperación y así comprobar la carga real del producto final.

3. MARCO REFERENCIA

3.1 BASES LEGALES

- ✓ NTC 4833(Norma Técnica Colombiana). INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Industria de cosméticos. Requisitos microbiológicos para productos cosméticos. Tercera actualización. Bogotá (ICONTEC). 2012.
- ✓ ISO 18415 (INTERNATIONAL STANDARD). Cosmetics Microbiology. Detection of specified and non-specified microorganisms. First edition 2007-09-01. 2007.
- ✓ ISO 11930 (INTERNATIONAL STANDARD). Cosmetics Microbiology. Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product. First edition 2012-04-01.2013.
- ✓ ISO 21148 (INTERNATIONAL STANDARD). Cosmetics Microbiology. General instructions for microbiological examination: First edition 2005-10-15 2005.
- ✓ GTC 77 (INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN).Guía para determinar la efectividad de conservantes en formulaciones cosméticas. Primera actualización. Bogotá (ICOTEC). 2002.
- ✓ NTC 5150 (INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN).Antisépticos y Desinfectantes Químicos. Actividad Bactericida Básica. Método de Prueba y Requisitos (fase 1).Primera actualización. Bogotá (ICONTEC).2003.

- ✓ USP 37- NF 32 FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, 2014.
- ✓ RESOLUCION 2115. LOS MINISTERIOS DE LA PROTECCION SOCIAL Y DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Por medio de la cual se señalan las características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano.2007.

3.2 ANTECEDENTES

Una investigación realizada por la Microbióloga Zaloa Bravo, evaluó la efectividad dos desinfectantes: Clorhidrato de Polihexametileno Biguanida, Óxido de Lauril Dimetilamina y Propianato de amonio cuaternario, Clorhidrato de Polihexametileno Biguanida, a nivel hospitalario. Se realizaron varios ensayos con distintos diluyentes, entre ellos el caldo Letheen, con el fin de determinar la efectividad de recuperación de diferentes microorganismos expuestos, hallando que el caldo Letheen fue efectivo únicamente como neutralizante del producto Propianato de amonio cuaternario, Clorhidrato de Polihexametileno Biguanida. **Bravo (2016)**

En un estudio realizado por estudiantes de Microbiología Industrial de la Pontificia Universidad Javeriana, se ensayó un desinfectante en gel a base de alcohol para la desinfección a nivel clínico empleando a ***Pseudomonas aeruginosa***, ***Staphylococcus aureus*** y ***Enterococcus hirae*** como microorganismos de prueba y caldo Letheen como diluyente, determinando que el neutralizante no inhibió el desarrollo de los microorganismos de ensayo. **Marín et al., (2008)**,

Un estudio realiza por la estudiante de doctorado a Biología Águeda Hernández, evaluó diferentes desinfectantes aplicados en instrumentos médicos y superficies,

frente a *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium fortuitum*; se empleó el caldo Lethen como diluyente, estableciendo que fue eficaz para compuestos clorados hipocloritos de sodio y calcio, cloramina, ácido isocianurico y biguanidas. **Hernández, (2006).**

El laboratorio Lissia no cuenta con antecedentes con respecto a la efectividad del caldo Lethen en sus productos, no se han realizado ensayos de otros diluyentes para evaluar sus propiedades neutralizantes de diferentes conservantes químicos, solo se conoce lo que la ficha técnica específica y el proveedor.

4. MARCO TEORICO

4.1 PRODUCTO COSMÉTICO

Se entenderá por producto cosmético toda sustancia o formulación de aplicación local al ser usada en las diversas partes superficiales del cuerpo humano: epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos o en los dientes y las mucosas bucales, con el fin de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto y protegerlos o mantenerlo en buen estado y prevenir o corregir los olores corporales (**Decisión Andina 516 de 2002**).

4.1.1 Características fisicoquímicas de productos cosméticos

Los productos con determinadas características fisicoquímicas como pH intracelular ácido o alcalino, el A_w no permiten la proliferación de microorganismos que afecten los productos cosméticos. Cualquier número de factores fisicoquímicos o combinaciones de ellas en un producto puede crear un ambiente hostil que no apoyará el crecimiento microbiano o su supervivencia. La combinación de factores subletales aumentará la hostilidad del medio ambiente y

el tiempo de latencia. Si el entorno es suficientemente hostil, la fase de adaptación se extenderá hasta el infinito y por lo tanto causará la muerte celular. La combinación de factores letales producirá una muerte celular rápida **(NTC 4833)**.

El pH extremo, ya sea ácido o alcalino, implica gasto energético para los microorganismos, necesario para mantener el pH intracelular; en las soluciones hidroalcohólicas, el crecimiento microbiano está impedido por la presencia de alcohol. En sistemas acuosos que contienen más de 20% por masa volumétrica de alcohol a temperaturas de llenado superiores a 65°C, con un tiempo de retención de 10 minutos, pueden provocar la inactivación térmica de la biocarga microbiana. Las células bacterianas vegetativas mueren debido a la degradación de las proteínas celulares. El metabolismo y la reproducción de microorganismos exigen la presencia de agua disponible, de tal manera que la disminución de actividad de **agua (a_w)** causa un aumento en la fase de latencia de crecimiento, por ende una disminución del crecimiento y un descenso del recuento celular total **(NTC 4833)**.

4.1.1.1. Características fisicoquímicas de talcos

Aspecto: Polvo fino, libre de grumos y de partículas extrañas

Color: Blanco

Olor: Fragancias comparadora con el estándar

Densidad aparente (23°C): 0,36-0,85

Densidad apisonada (23°C): 0,48- 0,62 g/mL

4.1.1.2. Características fisicoquímicas de jabón líquido

Aspecto: Líquido viscoso, homogéneo y libre de partículas

Color: Naranja claro nacarado (Comparado con el estándar)

pH (23°C): 5,5 - 6,5

Viscosidad (23°C)(Aguja 3/6 rpm): 3.700 - 5.00 cP

Densidad(23°C):0,980 - 1.020 g/mL

Centrifugación (3600 rpm X 15 min):No presenta cambios en su aspecto.

4.1.1.3. Características fisicoquímicas de crema Q10

Aspecto: Crema homogénea y libre de partículas

Color:Blanco (comparado con el estandar)

Olor:Fragancia (comparado con el estándar)

pH (37 +/- 3°C):5,5 - 6,5

Viscosidad (37 +/- 3°C)(Aguja 4/12 rpm):20.000 - 35.000 cP

Densidad (37 +/- 3°C): 0,900 - 1,100 g/mL

Centrifugación (3600 rpm X 15 min):No presenta cambios en su aspecto

4.1.2 Aseguramiento de la calidad de productos cosméticos

En la industria cosmética, hay aspectos principales como lo son la infraestructura, procedimientos y procesos, necesarios para la producción de cosméticos que cumplan con todas las exigencias del consumidor. Están señaladas dentro del sistema de garantía de calidad, la cual se caracteriza por ser un instrumento empleado, que apoya las diferentes etapas de producción generando así productos de calidad y reconocimiento ante sus clientes.

El control de calidad está inmerso en las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) que agrupa las normas acerca de organización, documentación y procesos como muestreo, fabricación, análisis y evaluación de todos los factores que intervienen

en el proceso productivo, asegurando que cada proceso es llevado a cabo bajo las condiciones que garantizan que los materiales y productos son liberados para su uso, venta o suministro con un alto nivel de calidad que ha sido juzgado como satisfactorio. El control de calidad no está confinado a operaciones de laboratorio, debe estar involucrado en todas las decisiones concernientes a la calidad del producto. Las BPM son dirigidas previamente a disminuir riesgos inherentes en cualquier etapa de la producción cosmética, que puede alterar la calidad del producto final. La principal finalidad es llegar a la prevención de dos tipos principales de riesgo: Contaminación cruzada y confusiones causadas por mal etiquetado en los contenedores o recipientes. **Ortiz (2008)**.

4.1.3 Conservantes en productos cosméticos

Se entiende por conservantes las sustancias que se añaden como ingredientes a los productos cosméticos y/o farmacéuticos principalmente para inhibir el desarrollo de microorganismos.

El metilparabeno y propilparabeno son comúnmente utilizados en las formulaciones en la industria farmacéutica, cosmética, y de alimento; estos conservantes pueden ser utilizados de forma individual, o en combinación con otros parabenos u otros agentes antimicrobianos. En la industria cosmética el metilparabeno es el agente antimicrobiano más usado, los parabenos poseen mayor actividad en mohos y levaduras, aunque también bacteriana, entre estos son más efectivos para las bacterias Gram positivas, aunque también poseen actividad antimicrobiana para las Gram negativas (**Arthur, 2000**).

El Alcohol bencílico es un conservante antimicrobiano con acción bacteriostática, empleado principalmente contra bacterias Gram positivas y algunos mohos, se emplea como solubilizante, ya que es un coadyuvante para aumentar la solubilidad de muchas sustancias. Además el alcohol bencílico diluido posee una

actividad anestésica local débil y antipruriginosa, utilizándose en algunas preparaciones para este fin.

La metilisotiazolinona es utilizada en las formulaciones cosméticas por su poder biocida, debido a su gran eficacia a concentraciones bajas para eliminar tanto bacterias como levaduras y algas que pueden contaminar diferentes productos de cosmética, cremas, lociones para la piel, shampoos y geles (**Schülke & Mayr**).

4.1.4 Diluyentes y Neutralizantes en la industria cosmética

Los diluyentes como el agua Peptona son medios enriquecidos pero no selectivos encargados en la recuperación de células que hayan sufrido algún daño en su pared celular o membrana citoplasmática, su composición la peptona de carne constituye la base nutritiva para el desarrollo de microorganismos, el cloruro de sodio y los fosfatos mantiene el balance osmótico.

El caldo Letheen utilizado como diluyente y neutralizante, por su constitución le brinda una mayor recuperación a los microorganismos que presentan algún deterioro en su pared celular, la peptona, el extracto de carne y la lecitina de soya, aportan los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano, como también tiene la capacidad para neutralizar desinfectantes compuestos de amonio cuaternario, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico el polisorbato 80 (Tween 80), es útil para neutralizar compuestos tales como fenol, formalina, hexaclorofeno, la combinación de la lecitina con el Tween 80, permiten neutralizar etanol (**MERCK**).

El caldo digerido de caseína-soya-polisorbato 20, este medio de dilución, tiene la capacidad para neutralizar desinfectantes, debido a la presencia de lecitina de soja, que neutraliza compuestos de amonio cuaternario. El agregado de polisorbato 20 (Tween 20), es útil para neutralizar compuestos tales como fenol, formalina, hexaclorofeno, y la combinación de la lecitina con el Tween, permiten neutralizar etanol (**Laboratorio Britania**)

4.2 Riesgos biológicos en la industria cosmética

La contaminación de productos cosméticos por microorganismos ha sido extensamente estudiada tanto a nivel nacional como internacional. Los productos cosméticos pueden contaminarse con mohos filamentosos, levaduras y bacterias. Las materias primas naturales, los equipos, el agua, los operarios, el aire, y el material de envase pueden ser fuentes de contaminación de los productos farmacéuticos y cosméticos. La Administración de Medicamentos y Alimentos FDA reconoce tres categorías de microorganismos: patógenos, oportunistas y objetables: Patógenos son aquellos microorganismos o toxinas responsables de enfermar o infectar al hombre (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, etc.). Se consideran oportunistas a aquellos microorganismos que producen enfermedad en pacientes inmunocomprometidos; son objetables aquellos microorganismos que pueden inactivar drogas y/o deteriorar el producto provocando una posible falta de eficacia de los productos farmacéuticos y seguridad en cosméticos. Un medicamento o un cosmético se considera contaminado si contiene microorganismos patogénicos, oportunistas, objetables o metabolitos microbianos tóxicos, o si presentan deterioro físico o químico ya encuentra fuera de la normatividad **Cerra et al. (2013)**.

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 difíciles de remover con el uso de agentes sanitizantes.

Escherichia coli es parte de la biota normal fecal de humanos y animales inferiores, sin embargo, algunas cepas pueden producir infecciones del tracto urinario y de heridas **Cerra et al. (2013)**. La presencia en un producto cosmético involucraría una posible contaminación fecal.

La presencia de *Staphylococcus aureus* en una materia prima o producto cosmético, indica que la fuente de contaminación puede ser humana. Estos microorganismos pueden ser transportados por el polvo, piel, ropa y microgotas de humedad que se generan al moverse, hablar y estornudar (FDA, 2001).

4.2.1 Especificaciones microbiológicas y fisicoquímicas para productos cosméticos en Colombia (Resolución 1482).

ÁREA DE APLICACIÓN Y FASE ETARIA	LÍMITES DE ACEPTABILIDAD
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Productos para uso infantes (hasta 3 años) ✓ Productos para Área de ojos. ✓ Productos que entran en contacto con las membranas mucosas. 	<ul style="list-style-type: none"> a. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales. Límite máximo 5×10^2 UFC/g o ml. b. Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en 1g o ml. c. Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en 1g o ml. d. Ausencia de Coliformes totales, en 1g o ml.
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Demás productos cosméticos susceptibles de contaminación microbiológica 	<ul style="list-style-type: none"> a. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales. Límite máximo 5×10^3 UFC/g o ml. b. Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en 1g o ml. c. Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en 1g o ml. d. Ausencia de Coliformes totales, en 1g o m.
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Productos a ser utilizados en los órganos genitales externos 	<ul style="list-style-type: none"> a. Ausencia total de <i>Cándida albicans</i>

(Resolución 1482).

4.2.2 Excepciones de análisis microbiológico, de acuerdo a condiciones desfavorables para el crecimiento de los microorganismos (Resolución 1482).

Condición	Límite
pH ácido	≤ 3,0
pH alcalino	≥ 10,0
Soluciones hidroalcohólicas	≥ 20%
Temperatura de llenado	≥ 65,0 °C
Actividad del agua (a/w)	≤ 0,75
Producto de base solvente	Sin límite
Productos oxidantes	Sin límite
Clorhidrato de aluminio y sales relacionadas	15% al 25%

(Resolución 1482).

4.3 Antecedentes de productos cosméticos contaminados

Según el informe RAPEX Sistema Europeo de Alertas Rápidas para productos peligrosos:

En la primera semana del mes de Enero del 2017 en Portugal se emitió una alerta a nivel microbiológico por la presencia de bacterias aerobias mesófilas, mohos y levaduras en una crema de dientes fabricada en la India. El recuento de estos microorganismos fue de 187500 UFC/g para aerobias mesófilas y de 3000 UFC/g para mohos y levaduras. Existe el riesgo de contraer infecciones ya que la solución puede entrar en contacto con la boca, las manos y los ojos. El producto no cumple con el Reglamento de Productos Cosméticos. Medidas ordenadas por las autoridades públicas de retirar el producto del mercado.

Para la segunda semana del mes de mayo del 2017, se presentó en Alemania una contaminación microbiológica en una crema de jabón líquido con un conteo de 2×10^6 UFC/g de *Enterobacter gergoviae*, que podría causar una reacción cutánea localizada y una infección ocular, particularmente en consumidores con un sistema

inmunológico debilitado. El producto no cumple con el reglamento de productos cosméticos. Fue retirado del mercado.

En Alemania para la primera semana de febrero del 2017se presentó una contaminación microbiológica por ***Pseudomonas aeruginosa***, y aerobios mesófilos, en una loción para el cuero cabelludo, se puede correr el riesgo de contraer una infección, por la solución puede entrar en contacto con la boca, las manos y los ojos. El producto no cumple con el reglamento de productos cosméticos. Fue retirado del mercado (**RAPEX**).

5. METODOLOGÍA

5.1 PREPARACIÓN DE CEPAS, E IDENTIFICACIÓN DE LA DILUCIÓN

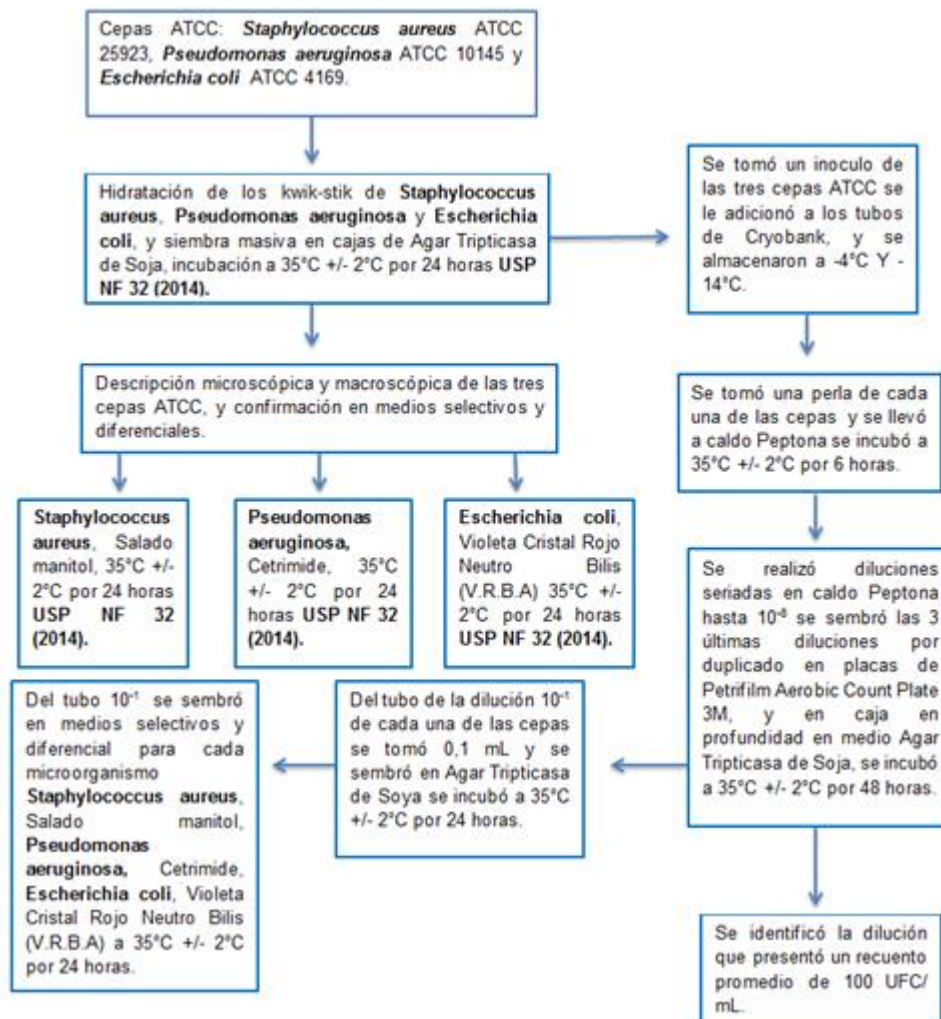


Figura1. Secuencia de pasos para la preparación de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, en la identificación de la dilución.

5.2 Selección y análisis microbiológico de las diferentes matrices.

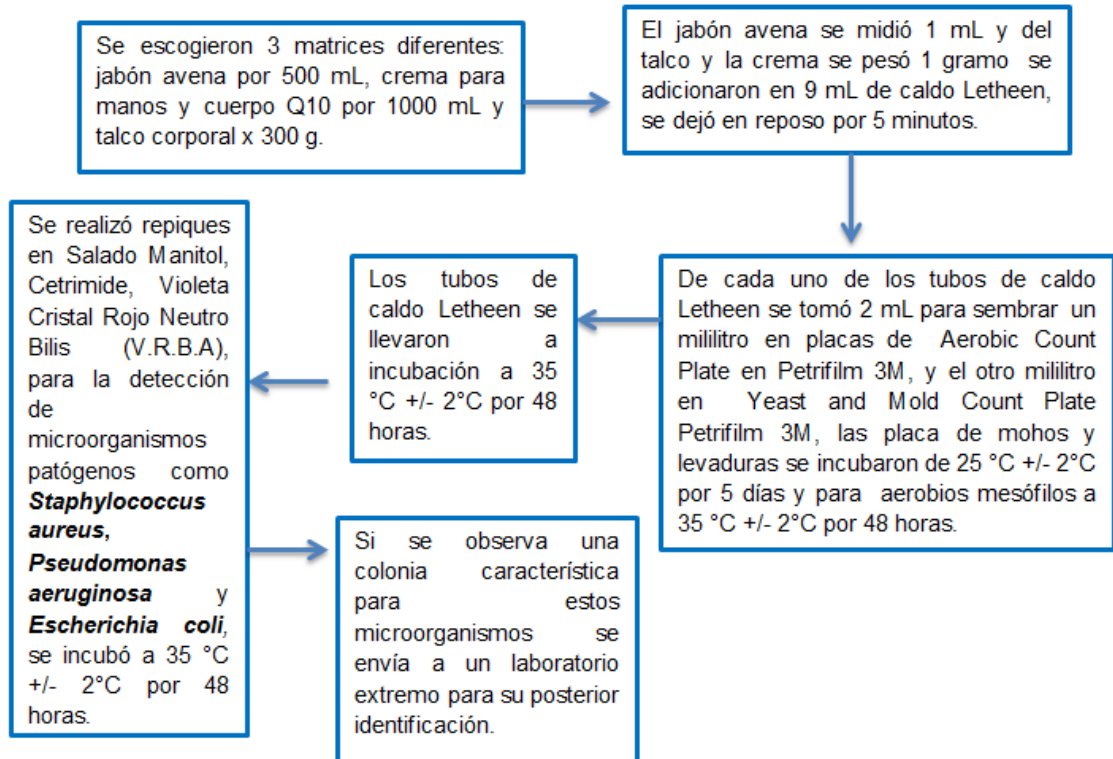


Figura 2. Procedimiento interno Laboratorio Lissia para el análisis microbiológico de producto terminado.

5.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE LOS DILUYENTES EN PETRIFILM 3M Y RECuento EN PLACA.

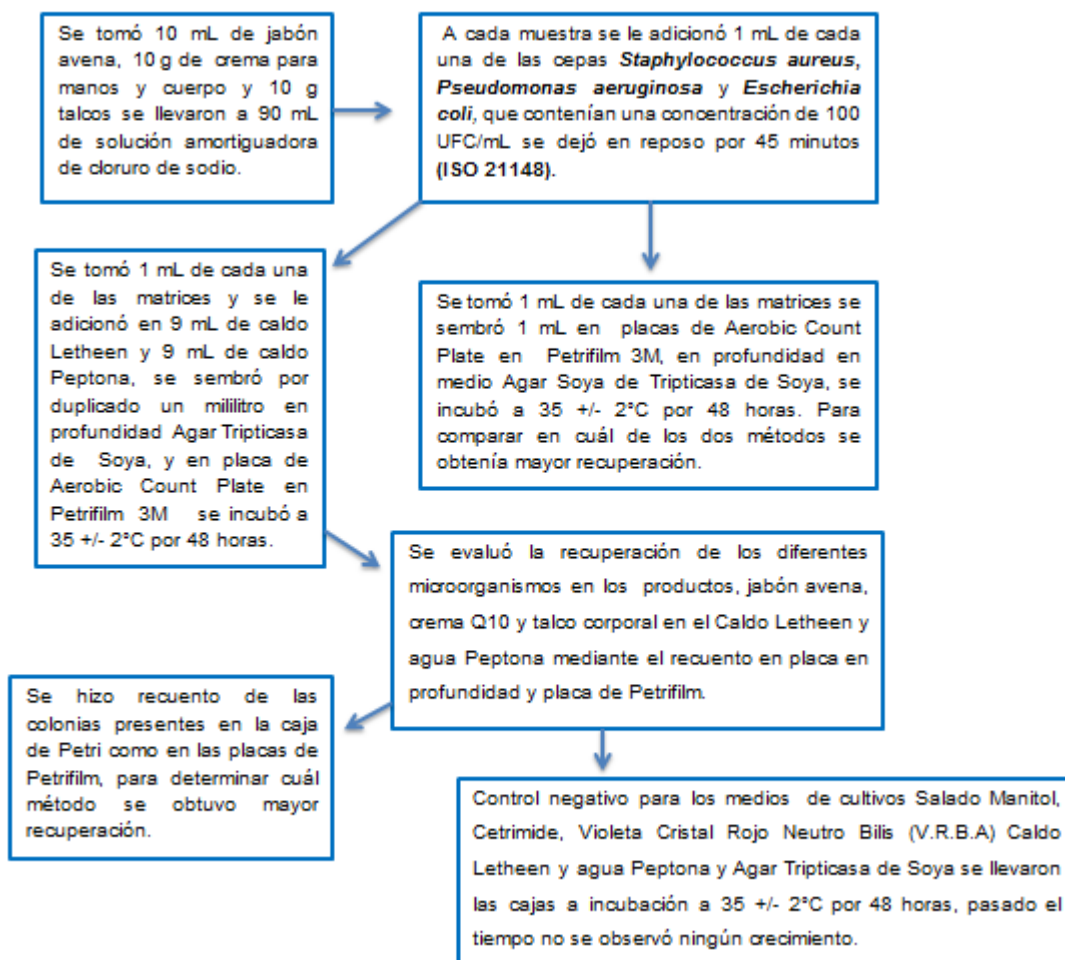


Figura 3. Secuencia de pasos para la estimación de la capacidad de los diluyentes en los dos métodos.

5.4 Actividades complementarias rutinarias descritas en el perfil del Analista de Control de Calidad con respecto al cargo por procedimientos internos basados en las NTC 4833 y USP NF 32 2014

5.4.1 Análisis microbiológico de materias primas, producto en proceso y producto terminado

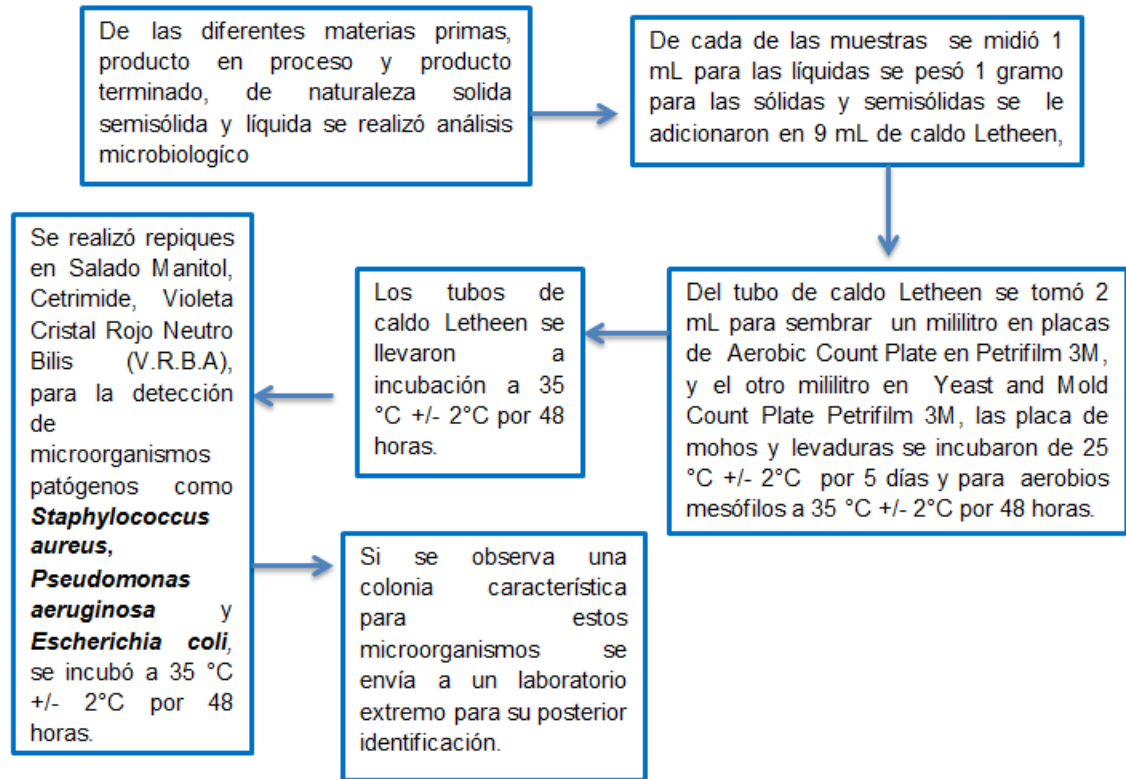


Figura 4. Procedimiento interno Laboratorio Lissia para el análisis microbiológico de materia prima, producto en proceso y producto terminado.

5.4.2 Análisis microbiológico a superficies, equipos en planta, operarios, ambientes y aguas

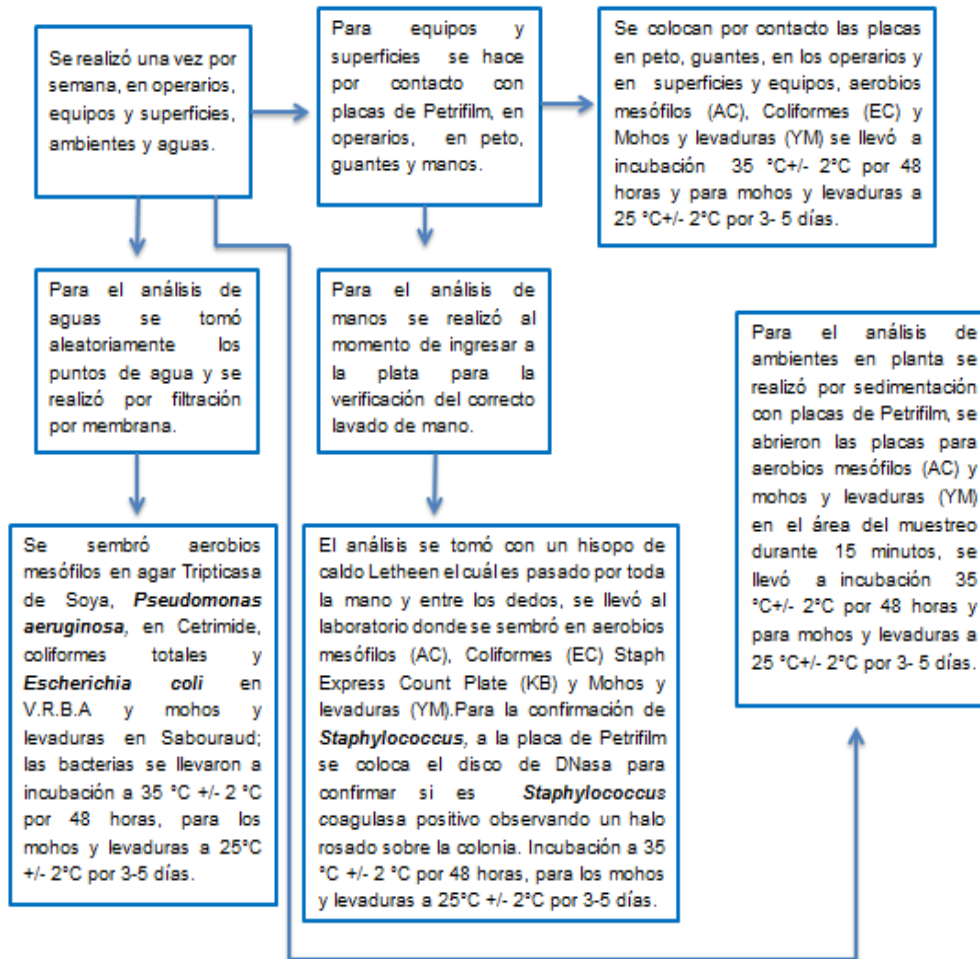


Figura 5. Procedimiento interno Laboratorio Lissia para el análisis microbiológico de operarios, áreas, superficies y aguas.

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades/Semanas		Enero				Febrero				Marzo				Abril				Mayo				Junio					
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
1	Presentación e inducción																										
2	Análisis microbiológicos en productos cosméticos (materia prima, producto en proceso y producto terminado) análisis a operarios y análisis de aguas en planta de producción.																										
3	Selección del tema de trabajo de grado																										
4	Revisión Bibliográfica																										
5	Esquema de metodología y cronograma.																										
6	Activación de las cepas y caracterización en medios selectivos																										
7	Análisis microbiológicos a las diferentes matrices (jabón avena, crema Q10 y talcos)																										
8	Identificar la dilución para cada microorganismo																										
9	Ensayo en los productos (jabón avena, crema Q10 y talcos) con las cepas de referencia.																										
10	Análisis de resultados																										
11	Escritura del trabajo de grado																										
12	Entrega del trabajo escrito																										
13	Sustentación del trabajo de pasantía																										

7. RESULTADOS

7.1 Confirmación de la viabilidad de las cepas ATCC

Se confirmó la viabilidad de las cepas de referencias ATCC con crecimiento en medio selectivo y tinción de Gram característico para cada microorganismo empleado.

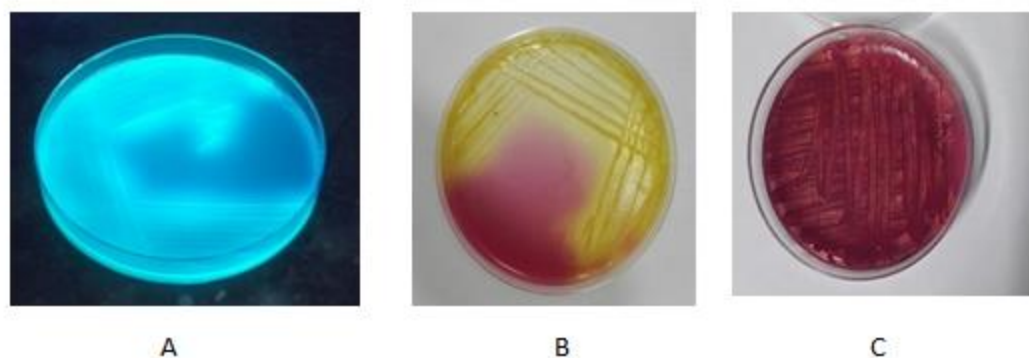


Figura 6. A. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en medio Cetrimide, B. Crecimiento *Staphylococcus aureus* en medio Salado Manitol, C. Crecimiento de *Escherichia coli* en medio V.R.B.A (Tomada por Galeano Eneida 2017, Cepas de referencia ATCC, en medios selectivos. Laboratorios Lissia).

Tabla 2. Descripción macroscópica y microscópica de las cepas ATCC.

MICROORGANISMO	MEDIO DE CULTIVO	TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA	DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Salado Manitol	35 °C +/- 2°C 24 horas	Colonias redondas amarillas con un precipitado amarillo alrededor de cada colonia.	Cocos Gram positivos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	Cetrimide		Colonias pequeñas de color verdoso, con fluorescencia verdosa a la luz ultravioleta.	Bacilos Gram negativos
<i>Escherichia coli</i> ATCC 14169	Violeta Cristal Rojo Neutro Bilis (V.R.B.A)		colonias profundas rojas con precipitado rojo alrededor, colonias puntiformes	Bacilos Gram negativos

7.2 Determinación de la dilución para cada microorganismo.

Teniendo en cuenta que el laboratorio no cuenta con los equipos necesarios para determinar la transmitancia de las soluciones de microorganismos, ni en su defecto con las soluciones que se emplean para la elaboración del patrón de McFarland, fue necesario desarrollar diluciones después de determinado tiempo de incubación de las perlas en las cuales se encontraban las cepas empleadas, para así establecer la dilución que presentaba 100 UFC que recomienda el método y de esta manera cuantificar las UFC que iban a ser inoculadas en cada una de las matrices seleccionadas (tabla 5).

Tabla. 3 Tiempo de incubación y dilución, para cada uno de los microorganismos.

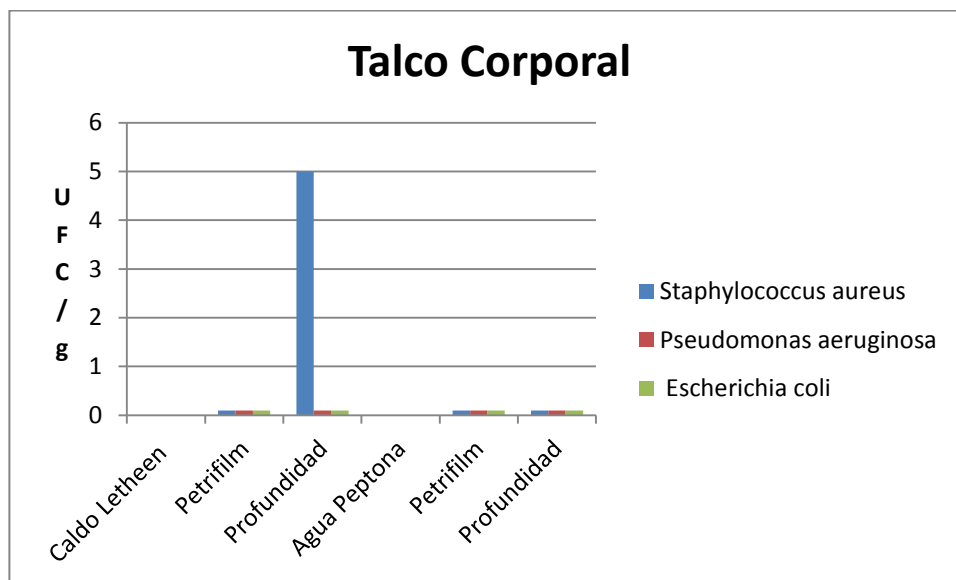
MICROORGANISMO	TIEMPO DE INCUBACIÓN Y TEMPERATURA	DILUCION CON 100 UFC/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 25923	35 °C +/- 2°C 6 horas	10 ⁻⁶
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATTC 10145	35 °C +/- 2°C 6 horas	10 ⁻⁴
<i>Escherichia coli</i> ATTC 14169	35 °C +/- 2°C 6 horas	10 ⁻⁸

7.3 Análisis microbiológicos a los productos jabón avena, crema Q 10 y talcos.

Los productos seleccionados como matrices para realizar los diferentes ensayos fueron seleccionados en lotes de los cuales ya habían sido previamente aprobados y adicionalmente las muestras debieron ser analizados microbiológicamente antes de la inoculación con las cepas ATCC para establecer un control negativo y de esta forma asegurar la calidad de los resultados, pues la presencia de microorganismos en las muestras sin ser inoculados conlleva a la variación de los resultados ver **Anexo 1 , 2, 3, 4, 5 y 6.**

7.4 Estimación de la capacidad neutralizante en la recuperación de las tres cepas inoculadas en talcos corporales.

La recuperación de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* en la matriz talcos corporales se puede visualizar en la gráfica 1, teniendo en cuenta que los ensayos se llevaron a cabo utilizando los 2 métodos Petrifilm y siembra en profundidad para cada uno de los microorganismos anteriormente mencionados.

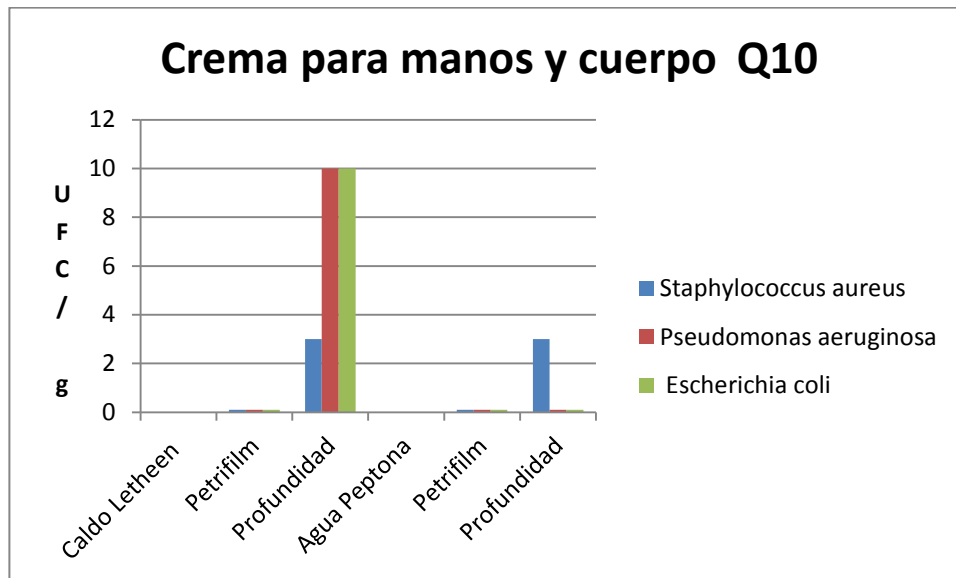


Gráfica 1: Recuento de la evaluación del neutralizante en talcos corporales con *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

A partir de los resultados obtenidos se evidencia que en lo que respecta a *Staphylococcus aureus* en la matriz sólida de talcos corporales, utilizando Caldo Lethéen y Agua Peptona, aplicando dos técnicas de siembra Petrifilm y profundidad, solo fue posible recuperar 5 UFC/g en caldo Lethéen mediante la técnica en profundidad a partir de una concentración inicial de 100 UFC/mL.

7.5 Estimación de la capacidad neutralizante en la recuperación de las tres cepas en crema para manos y cuerpo Q10

La recuperación de ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Escherichia coli*** en crema para manos y cuerpo Q10 se puede visualizar en la gráfica 2, teniendo en cuenta que los ensayos se llevaron a cabo utilizando los 2 métodos Petrifilm y siembra en profundidad para cada uno de los microorganismos anteriormente mencionados.

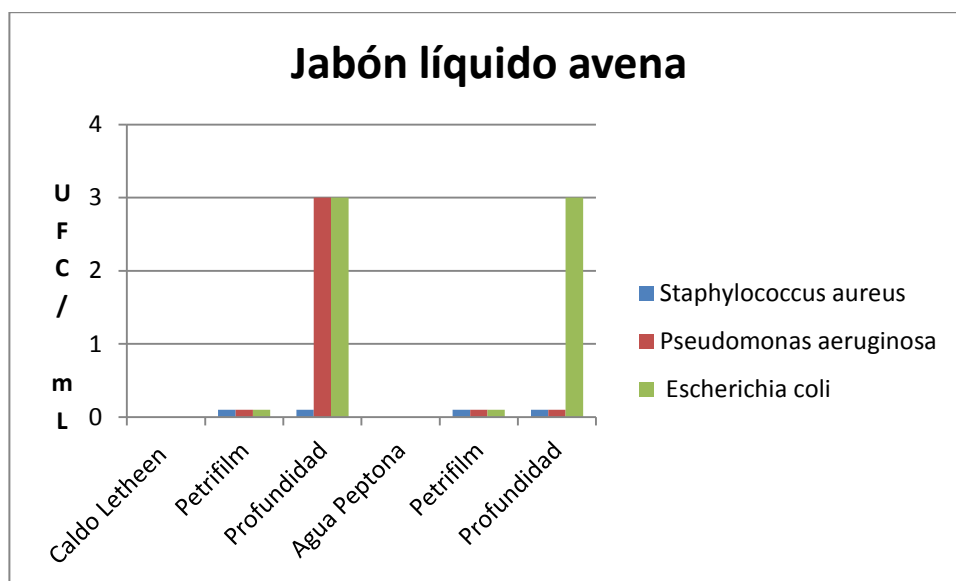


Gráfica 2: Recuento de la evaluación del neutralizante en crema para manos y cuerpo Q10 con ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Escherichia coli***.

Los ensayos realizados para determinar la capacidad neutralizante de los medios utilizados como diluyentes en el caso de ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Escherichia coli*** en la matriz crema para manos y cuerpo Q10, permiten determinar que no se observó crecimiento empleando el método de Petrifilm, mientras que para el caso del método de siembra en profundidad se observó crecimiento fue de 10 UFC/g ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Escherichia coli*** y 3 UFC/ g para ***Staphylococcus aureus***.

7.6 Estimación de la capacidad neutralizante en la recuperación de las tres cepas en jabón líquido avena.

La recuperación de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* en jabón líquido avena se puede visualizar en la gráfica 3, teniendo en cuenta que los ensayos se llevaron a cabo utilizando los 2 métodos Petrifilm y siembra en profundidad para cada uno de los microorganismos anteriormente mencionados.



Gráfica 3: Recuento de la evaluación del neutralizante en jabón líquido avena con *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Los ensayos realizados para determinar la capacidad neutralizante de los medios utilizados como diluyentes en el caso de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* en jabón líquido avena, permiten determinar que no se observó crecimiento empleando el método de Petrifilm, con *Staphylococcus aureus*, mientras que para el caso del método de siembra en profundidad se observó crecimiento fue de 3 UFC/g *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

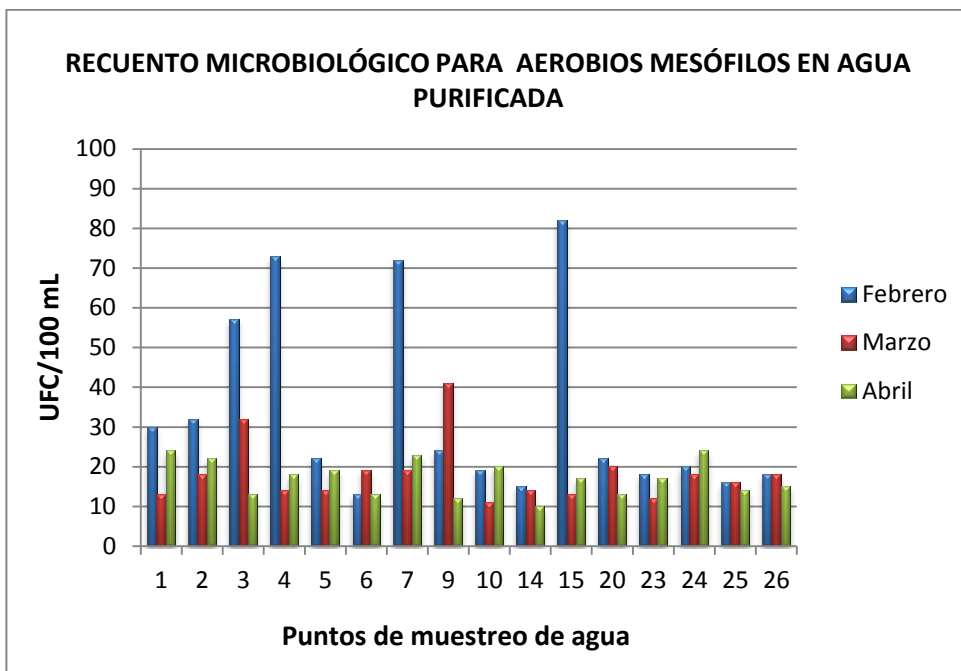
7.7. Resultados de actividades complementarias

En la siguiente tabla (tabla 15) se resumen los resultados desde Febrero hasta Abril 2017, del análisis de agua potable en Laboratorios Lissia.

Tabla 4. Resultados de análisis microbiológico de los diferentes puntos de aguas potable en Laboratorios Lissia desde el mes de Febrero hasta Abril del 2017.

Punto	Descripción	Bacterias aerobias mesófilas Máximo 10 UFC/100 mL	Mohos Máximo 10 UFC/100 mL	Levaduras Máximo 10 UFC/100 mL	Coliformes totales Ausencia Presencia	<i>E. Coli</i> Ausencia Presencia	<i>P. aeruginosa</i> Ausencia Presencia
11	Tanque pulmón - agua potable	0	0	0	Ausencia	Ausencia	Ausencia
12	Entrada de filtros multimedia	0	0	0	Ausencia	Ausencia	Ausencia
13	Salida de multimedios	0	0	0	Ausencia	Ausencia	Ausencia
16	Salida de filtro de 1 micra	0	0	0	Ausencia	Ausencia	Ausencia
17	Salida de resinas catiónicas	0	0	0	Ausencia	Ausencia	Ausencia
18	Salida de resinas catiónicas	0	0	0	Ausencia	Ausencia	Ausencia

El límite permitido según la **Resolución 2115 (2007)** 100 UFC/100 mL para agua potable; el límite de alerta en laboratorios Lissia para agua potable son 10 UFC/100 mL. Para el recuento de coliformes totales, *E. Coli* y *P. aeruginosa* la especificación es ausencia. Como se evidencia en la tabla 15, el agua potable que ingresa en laboratorios Lissia se encuentra dentro de las especificaciones mencionadas.



Grafica 4. Resultados de análisis microbiológico (Aerobios mesófilos) de los diferentes puntos de aguas purificada en Laboratorios Lissia desde el mes de Febrero hasta Abril del 2017.

Leyenda de los puntos de agua purificada en Laboratorios Lissia

Puntos 1, 2, 3 y 4: Fabricación de líquidos

Puntos 5, 6, 7 y 9: Fabricación de semisólidos

Punto 10 y 23: Fabricación de tintes

Punto 14: Salida de resinas (un par)

Punto 15: Tanque de almacenamiento

Punto 20: Salida de resinas (dos par)

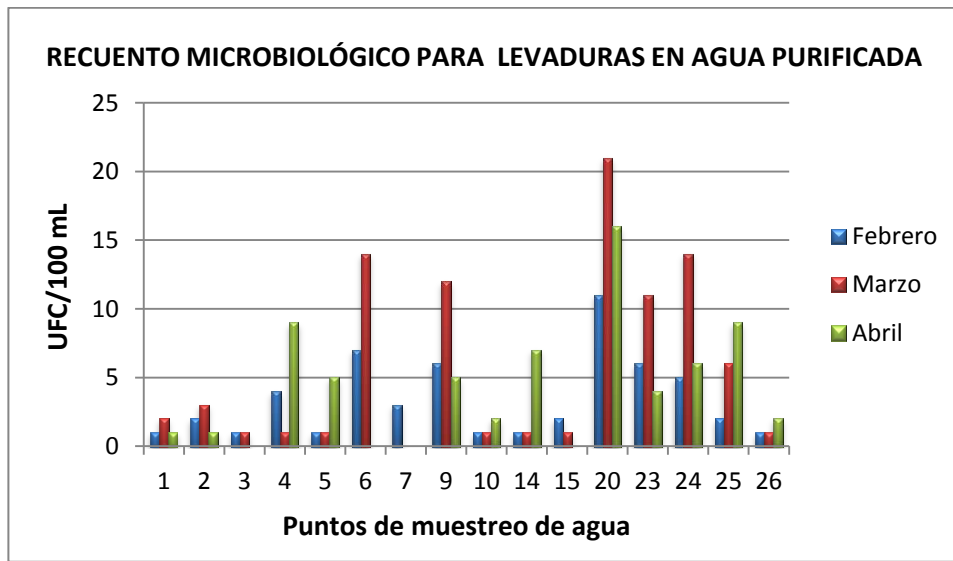
Punto 24: Fabricación de enjuagues bucales

Punto 25: Fabricación de soluciones hidroalcohólicas

Punto 26. Fabricación de geles.

En la gráfica 4, se resumen los recuentos microbiológicos para aerobios mesófilos de agua purificada de los meses Febrero hasta Abril 2017, realizados en Laboratorios Lissia. El límite de alerta emitido por la **USP NF 32 (2014)** es de 100

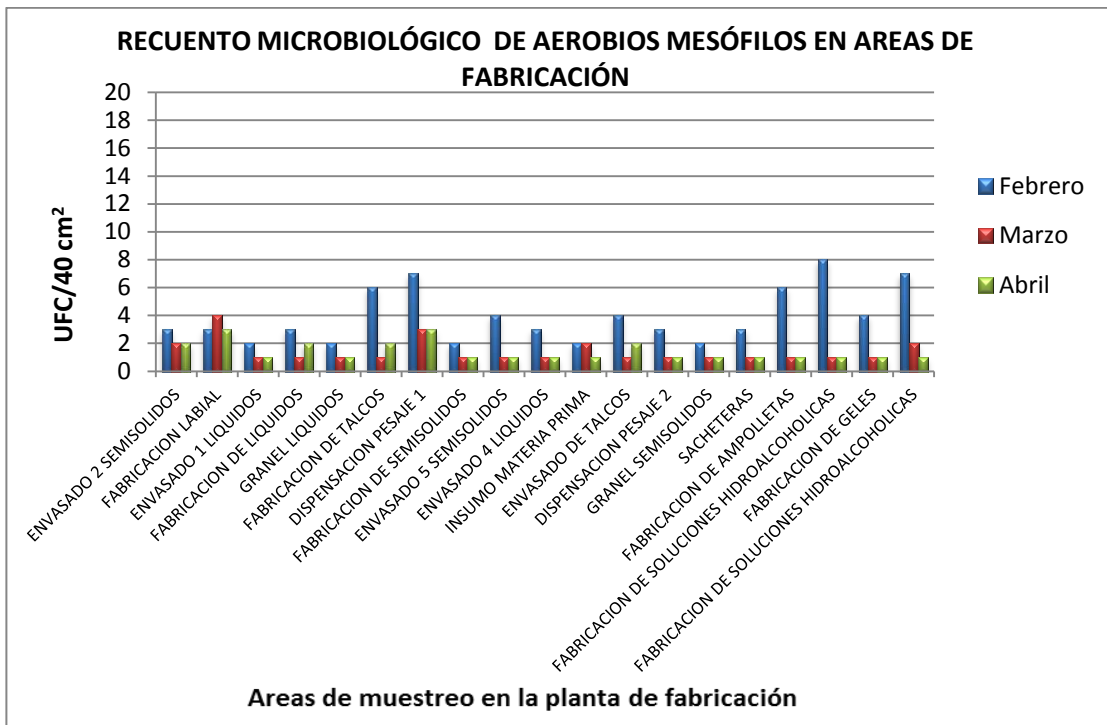
UFC/ mL; el límite de alerta en laboratorios Lissia es de 500 UFC/ 100 mL. Como se evidencia el agua purificada se encuentra dentro de las especificaciones establecidas, observándose el mayor recuento en el mes de febrero en el punto 15 (tanque de almacenamiento) con 82 UFC/100mL.



Grafica 5. Resultados de análisis microbiológico (Levaduras) de los diferentes puntos de aguas purificada en Laboratorios Lissia desde el mes de Febrero hasta Abril del 2017.

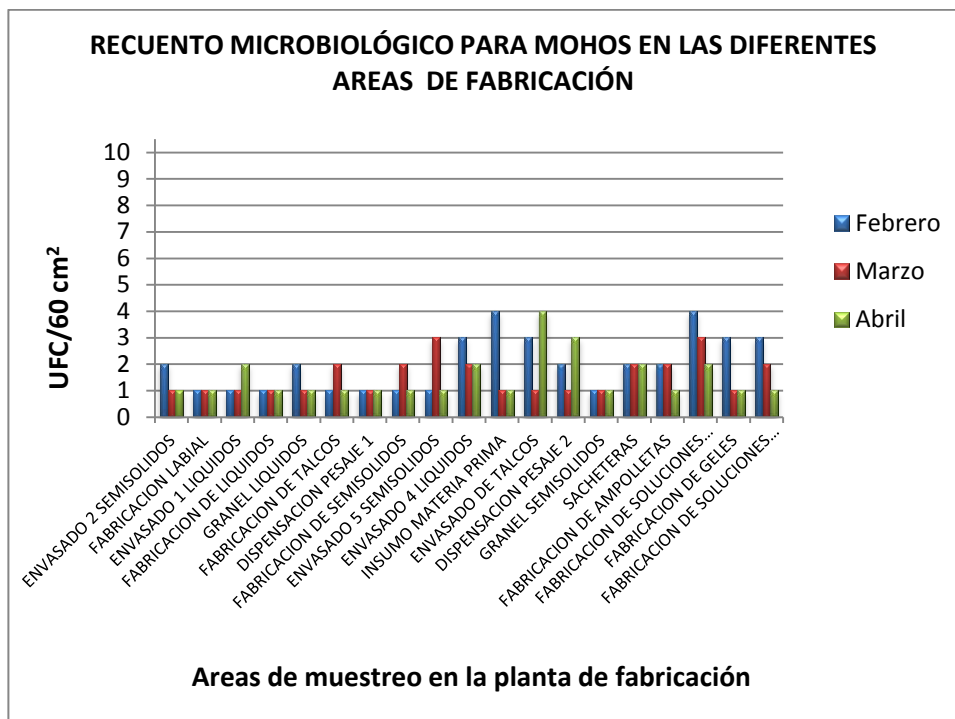
En la gráfica 5, se resumen los recuentos microbiológicos para levaduras en agua purificada de los meses de Febrero hasta Abril 2017, realizados en Laboratorios Lissia. Límite de alerta emitido por la **USP NF 32 (2014)** es de 100 UFC/mL; Límite de alerta en laboratorios Lissia, 500 UFC/ 100 mL. Como se evidencia el agua purificada se encuentra dentro de las especificaciones, evidenciándose el mayor recuento en el mes de marzo en el punto 20, con 22 UFC/100mL.

El recuento de mohos fue de cero UFC/ 100 mL; coliformes totales, ***E. Coli*** y ***P. aeruginosa*** ausencia en el análisis de agua purificada.

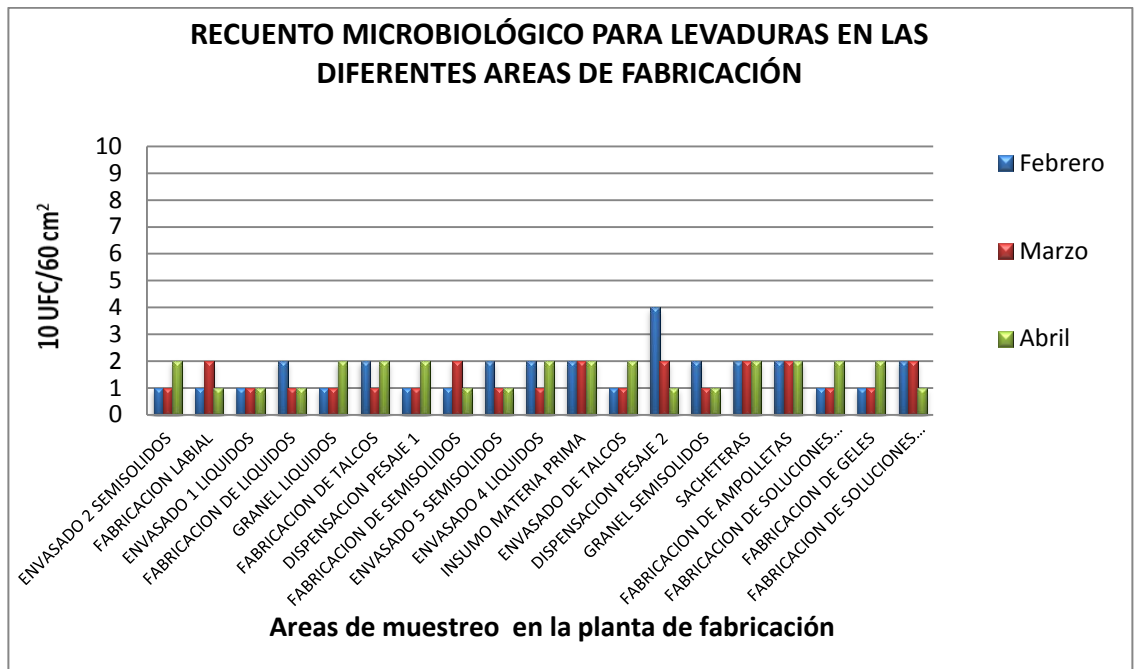


Gráfica 6. Recuento microbiológico de Aerobios mesófilos en las diferentes áreas de fabricación en Laboratorios Lissia desde el mes de Febrero hasta Abril del 2017.

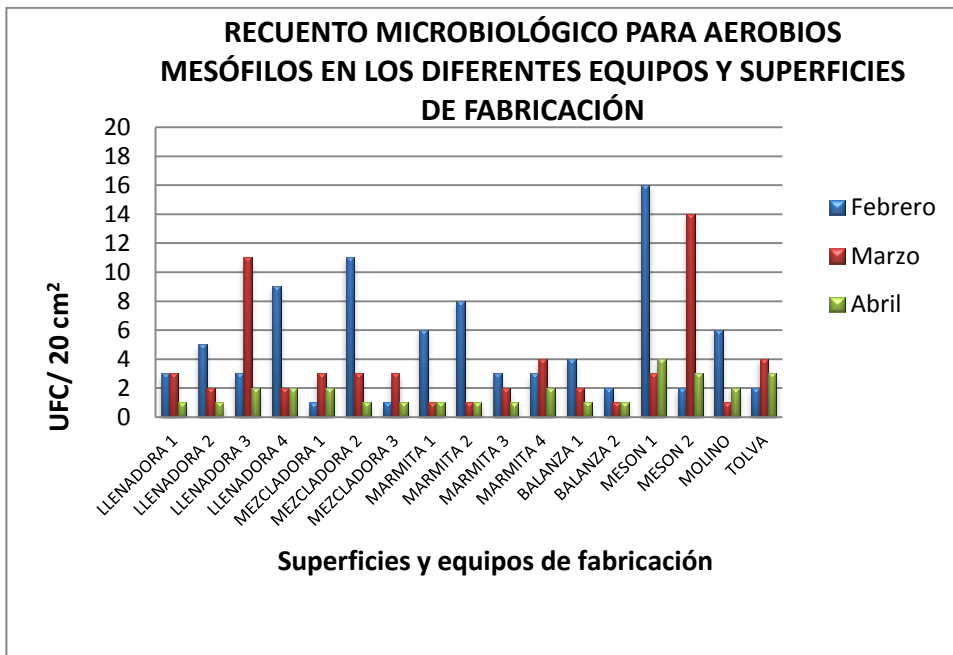
En la gráfica 6, se resumen los resultados de aerobios mesófilos para ambientes en la planta de fabricación en Laboratorios Lissia; para el control ambiental se maneja especificación interna, de acuerdo al histórico obtenido en la planta de fabricación siendo para aerobios mesófilos, 20 UFC/40 cm²/15 minutos de exposición. Según procedimiento interno de Laboratorio Lissia, en la gráfica se observa que se encuentra dentro de las especificaciones establecidas siendo el mayor recuento de 8 UFC/40cm²/15 minutos en el área de Fabricación de soluciones hidroalcohólicas.



Gráfica 7. Recuento microbiológico de Mohos en las diferentes áreas de fabricación en Laboratorios Lissia desde el mes de Febrero hasta Abril del 2017. En la gráfica 7 se resumen los resultados desde Febrero hasta Abril del 2017, para el análisis de mohos en las áreas de fabricación en Laboratorios Lissia. Especificación interna de acuerdo a histórico obtenido para mohos, 10 UFC/60 cm²/15 minutos de exposición. Se evidencia que en los tres meses el recuento de las áreas se encuentran dentro de las especificaciones, siendo el resultado más elevado de 4 UFC/ 60cm² en las áreas de muestreo de materias primas y fabricación de soluciones hidroalcohólicas en el mes de febrero. En el mes de abril se observa un recuento de 4 UFC/ 60 cm² en el área de envasado de talcos.

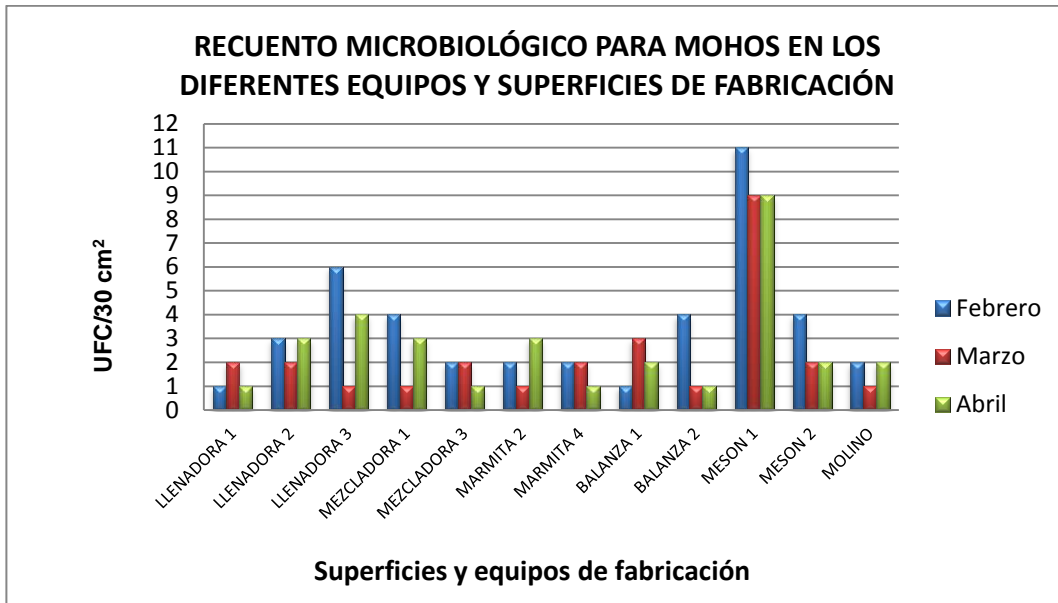


Gráfica 8. Recuento microbiológico de levaduras en las diferentes áreas de fabricación en Laboratorios Lissia de los meses Febrero hasta Abril del 2017. En la gráfica 8 se evidencian los resultados del análisis microbiológico para levaduras en los meses Febrero hasta Abril del 2017, en las áreas de fabricación en Laboratorios Lissia. La especificación interna de acuerdo al histórico obtenido para levaduras es de 10 UFC/60 cm²/15 min. Se observa que los resultados se encuentran dentro de los parámetros establecidos, siendo el mayor recuento en el mes de febrero de 4 UFC/ 60cm² en el área de dispensación pesaje 2.



Gráfica 9. Resultados de análisis microbiológico para aerobios mesófilos de las diferentes superficies y equipos de fabricación en Laboratorios Lissia desde el mes de Febrero hasta Abril del 2017.

En la gráfica 9 se resume los resultados desde Febrero hasta Abril 2017, del análisis microbiológico para aerobios mesófilos de superficies y equipos en la planta de fabricación en Laboratorios Lissia. Especificación interna para aerobios mesófilos, 20 UFC/20 cm². Los resultados obtenidos demuestra que los equipos y superficies se encuentran dentro de las especificaciones microbiológicas establecidas para aerobios mesófilos en los meses reportados siendo el mayor recuento 16 UFC/ 20cm² en el mes de febrero en el mesón número 1.



Gráfica 10. Resultados de análisis microbiológico para Mohos de las diferentes superficies y equipos de fabricación en Laboratorios Lissia desde el mes de Febrero hasta Abril del 2017.

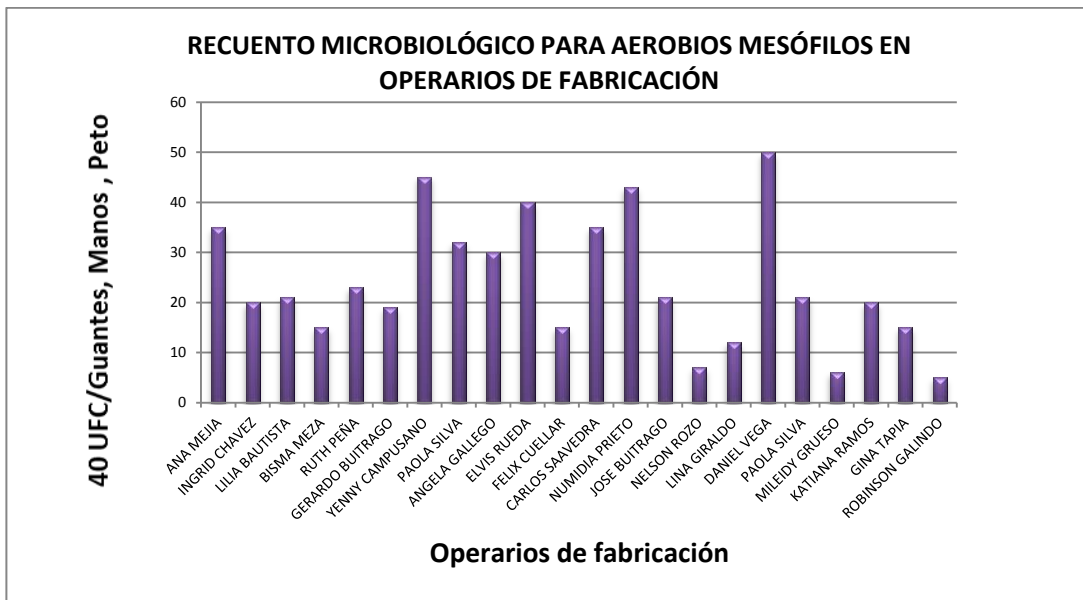
En la gráfica 10 se resumen los resultados desde Febrero hasta Abril 2017, del análisis microbiológico para Mohos de superficies y equipos en la planta de fabricación en Laboratorios Lissia, la especificación interna para mohos es de 10 UFC/30 cm². Se evidencia un resultado fuera de especificación con un recuento 11 UFC/ 30cm² en el mes de febrero en el mesón número 1.

Para el análisis de levaduras no se presentó crecimiento en los equipos y superficies para los meses de Febrero hasta Abril del 2017, el resultado de los análisis de coliformes totales y **E. Coli** fue ausencia en todos los equipos y superficies evaluados en los meses de Febrero hasta Abril del 2017. Especificación interna para levaduras, 10 UFC por 30 cm²; para coliformes totales y **E. Coli**, ausencia.



Gráfica 11. Resultados de análisis microbiológico para Aerobios mesófilos de los operarios de fabricación en Laboratorios Lissia del mes de Febrero del 2017.

En la gráfica 11 se resumen los resultados del mes de febrero del 2017, relacionado al análisis microbiológico para aerobios mesófilos de los operarios de fabricación en Laboratorios Lissia. Especificación interna para aerobios mesófilos: 40 UFC/Guantes, Manos, Peto. Se evidencia que de los 22 operarios analizados 8 presentaron un recuento superior a 40 UFC, lo equivale a 36,3% de los operarios analizados.



Gráfica 12. Resultados de análisis microbiológico para de aerobios mesófilos de los operarios de fabricación en Laboratorios Lissia del mes de Marzo del 2017.

En la gráfica 12 se resumen los resultados del mes de marzo del 2017, relacionado al análisis microbiológico para aerobios mesófilos de los operarios de fabricación en Laboratorios Lissia. Especificación interna para aerobios mesófilos: 40 UFC/Guantes, Manos, Peto. Se evidencia que de los 22 operarios analizados 3 presentaron un recuento superior a 40 UFC, lo equivale a 13,6% de los operarios analizados.



Grafica 13. Resultados de análisis microbiológico para de aerobios mesófilos de los operarios de fabricación en Laboratorios Lissia del mes de Abril del 2017.

En la gráfica 13 se resume los resultados del mes de abril del 2017, relacionado al análisis microbiológico para aerobios mesófilos de los operarios de fabricación en Laboratorios Lissia. Especificación interna para aerobios mesófilos: 40 UFC/Guantes, Manos, Peto. Se evidencia que de los 22 operarios analizados ningún operario presentó un recuento superior a 40 UFC.

Para el análisis de mohos y levaduras no se reportó crecimiento en los meses de Febrero hasta Abril en los operarios. La especificación interna para mohos y levaduras es de 15 UFC/ Guantes, Manos, Peto.

Para el análisis de coliformes totales y *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, la especificación es ausencia en Guantes, Manos, Peto. En los resultados del análisis para los tres meses reportados, no se evidenció crecimiento de coliformes totales y *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Al comparar las técnicas evaluadas en la recuperación de aerobios mesófilos, Petrifilm y siembra en profundidad, la técnica de siembra en profundidad fue la más sensible al momento de la recuperación de estos microorganismos, independientemente si se utilizaba caldo Lethen o agua Peptona. En estudios realizados anteriormente por **Figuroa et al., 2015**, se determinó que la recuperación en Petrifilm fue muy similar al método tradicional; estos autores, compararon la recuperación de aerobios mesófilos y detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en productos cárnicos, no obteniendo diferencias significativas entre el método tradicional y Petrifilm.

Otro ensayo realizado por **Battista et al., 2000** en la evaluación de Petrifilm y siembra en profundidad en el crecimiento de aerobios mesófilos en extractos vegetales, obtuvieron porcentajes de recuperación por ambos métodos similares, teniendo como ventaja adicional el método de Petrifilm su sencillez menor tiempo para obtención de resultados.

Para la evaluación de la recuperación de las tres cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* en talco corporal, se evidenció crecimiento del 5% para *Staphylococcus aureus* en caldo Lethen y método de profundidad. No se evidenció crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, esto se puede justificar debido a que la matriz utilizada es un producto sólido con a_w de 0,0117 (**Ficha de fabricación Laboratorio Lissia**). *Pseudomonas aeruginosa* requiere una cantidad de agua disponible de 0,97 y *Escherichia coli* de 0,95; sin embargo *Staphylococcus aureus* es menos exigente en este aspecto, puede crecer a una actividad de agua de 0,86 **Carrillo et al., (2007)**. Sin embargo es de señalar que la cantidad de UFC detectadas no corresponden con la cantidad inoculadas, y las mismas solo fueron recuperadas cuando se empleó como diluyente el caldo Lethen, lo

que permite inferir que el poder neutralizante si realizó un efecto de inactivación (incompleto) en el conservante presente en el talco corporal. La utilización del agua Peptona como diluyente no permitió la recuperación de ninguno de los microorganismos, el agente antimicrobiano presente en el talco no fue inactivado.

Para la evaluación de la recuperación de las cepas de ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Escherichia coli***, en crema para manos y cuerpo Q10, se evidenció crecimiento del 3% para ***Staphylococcus aureus***, empleando los dos diluyentes Caldo Lethen y Agua peptona en método de profundidad. Para ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Escherichia coli***, se obtuvo crecimiento del 10% empleando como diluyente caldo Lethen en profundidad. Para esta matriz se observa mayor reproducibilidad de los resultados tomando en cuenta el porcentaje de recuperación para cada microorganismo, nuevamente se evidencia mayor recuperación empleando como diluyente el caldo Lethen. Sin embargo es importante señalar que la cantidad inoculada no corresponde con la cantidad recuperada para ninguno de los microorganismos.

Para la evaluación de la recuperación de las cepas de ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Escherichia coli***, Jabón líquido avena, no se observó crecimiento para ***Staphylococcus aureus*** utilizando ambos diluyentes y realizando las dos técnicas de siembra descritas anteriormente. Para ***Pseudomonas aeruginosa*** se obtuvo un 3 % de recuperación utilizando como diluyente caldo Lethen en método de profundidad y para ***Escherichia coli***, se observó crecimiento del 3% tanto caldo Lethen como agua peptona en método de profundidad. Las UFC recuperadas no correspondieron con las inoculadas.

La capacidad neutralizante de los diluyentes utilizados en este estudio se ve cuestionada tanto para el diluyente caldo Lethen como para el agua Peptona; la recuperación de sólo 5% en los talcos corporales y del 3% para crema para manos y cuerpo Q10 con ***Staphylococcus aureus***, adicionalmente en esta última matriz con ***Escherichia coli*** y ***Pseudomonas aeruginosa*** y en jabón líquido avena para ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Escherichia coli*** la recuperación no fue superior al

50%, límite que debe ser superado para establecer si un diluyente permite la recuperación de los microorganismos. En la mayoría de los ensayos se obtuvo mayor crecimiento empleando el caldo Letheen; esto se pudo dar por tener en su composición Tween 80 y lecitina de soya que tienen la capacidad de inhibir los conservantes añadidos en los productos y brindar las condiciones necesarias para que los microorganismos en dicho producto se puedan recuperar. La totalidad de las UFC inoculadas en los diferentes productos no se pudieron detectar; otros ensayos partieron de concentraciones iniciales más altas; **Marín et al., (2007)** desafiaron al neutralizante en varios tiempos de exposición teniendo presente que se inocularon 10^6 UFC/mL del microorganismo de prueba y obteniendo recuperaciones en cantidades similares a las inoculadas. Se debe tener claro que primero se debe escoger el neutralizante frente a los conservantes que tienen los productos que se van a estudiar con el fin de seleccionar el más efectivo para cada producto **Bravo (2016)**.

Es importante mencionar que la composición de cada una de las matrices es diferente, por lo tanto cada una aporta nutrientes y condiciones que pueden favorecer o perjudicar el crecimiento de los microorganismos de estudio. En laboratorios Lissia, la formulación de los productos es confidencial, sin embargo para la realización del trabajo de investigación se permitió compartir la naturaleza y grupo químico de los conservantes presentes en las matrices elegidas:

Para el caso del talco corporal se utiliza los parabenos (metil y propilparabeno), que poseen mayor actividad contra mohos y levaduras, aunque también actúan contra bacterias.

En la crema para manos y cuerpo Q10 y para el jabón líquido avena se utiliza una mezcla de conservantes que incluye: alcohol bencílico, metilcloroisotiazolinona y metilisotiazolinona; esta mezcla de amplio espectro actúa con mayor eficacia contra bacterias Gram positivas. En los resultados aquí expuestos, se evidencia menor recuperación de ***Staphylococcus aureus*** en las matrices que emplean esta mezcla de conservante.

El alcohol bencílico, metilcloroisotiazolinona y metilisotiazolinona, están autorizados para el empleo en productos que permanecen sobre la piel, no se recomiendan para productos destinados al tratamiento de las mucosas, ni tampoco en labiales y cremas dentífricas.

En un ensayo realizado por el fabricante de la mezcla de conservante utilizada en Laboratorios Lissia, para evaluar la reducción de bacterias en función de la concentración de la mezcla de conservante y el tiempo en exposición, se variaron tiempos de 3, 6, 24, 48,72 y 168 horas, obteniendo que se necesitaron 72 horas a una concentración de 0,15 % para inhibir en su totalidad el crecimiento de *Escherichia coli* y para *Pseudomonas aeruginosa* 48 horas (no se referencia ensayo de inhibición para *Staphylococcus aureus* u otra bacteria Gram positiva. **(Mezcla de conservante (2009) información para producto conservante, Producto cosmético. Bogotá. DC. FEHERMANN LTDA)**

Teniendo en cuenta todos estos resultados obtenidos a partir de los diferentes ensayos realizados para determinar la capacidad de neutralización de los diluyentes, se establece que en los ensayos realizados no se demostró la capacidad neutralizante a cabalidad de los dos diluyentes empleados, pues es claro que al determinar porcentajes de recuperación los valores fueron inferiores al 50%; la USP establece que el porcentaje de recuperación debe ser mayor al 50%, valor que no se obtuvo en ningún ensayo **USP NF32 (2014)**.

Al realizar una revisión de la capacidad neutralizante del caldo Letheen se observa que esta actividad se encuentra demostrada por estudios que soportan su eficacia **Bravo (2016)**. No se puede discutir en este estudio que la eficacia del caldo Letheen sea nula; se encuentran diferentes variables las cuales conllevan a obtener este tipo de resultados atípicos, entre ellas, se tiene las características fisicoquímicas de las matrices ensayadas; un claro ejemplo es la solubilidad de estas matrices con los diluyentes empleados, pues pueden ser productos solubles en agua, productos no grasos insolubles en agua, productos grasos, entre otros. En el caso del jabón líquido avena es un producto soluble en medio acuoso el cual se incorpora fácilmente en el diluyente de acuerdo a su naturaleza y su

composición que incluye tensoactivos. La crema para manos y cuerpos Q10, es una formulación O/W: lo cual expresa que contienen mayor proporción de agua que de productos oleosos y su incorporación es factible en medio acuoso. En el caso del talco corporal, es un producto sólido insoluble en medio acuoso, que para su análisis microbiológico se debe realizar una suspensión en el diluyente y agitar antes de realizar la siembra para garantizar la toma de una alícuota que contenga producto y de esta manera garantizar que el mismo no se encuentre sedimentado.

La USP establece que 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 de la muestra o a 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 **USP NF 32 (2014)**.

Al considerar estas indicaciones en nuestro caso, se deben desarrollar nuevos ensayos que permitan la recuperación de los microorganismos en las matrices seleccionadas

El aseguramiento de la calidad de los resultados microbiológicos es de suma importancia, por ende se considera necesario continuar con más investigaciones dentro del laboratorio que permitan determinar cuál variable está influenciando para que no se obtenga la recuperación de microorganismos en dichas matrices.

Con respecto a los resultados de las actividades complementarias se maneja información confidencial de la empresa. Sin embargo se comparten resultados desde febrero a abril del 2017, correspondientes a los análisis microbiológicos de muestras de agua, operarios, ambientes, superficies y equipos.

En el análisis de agua potable y agua purificada, la calidad de la misma es óptima en Laboratorios Lissia, comparada con el estándar de calidad microbiológica establecido en textos oficiales como la USP NF 32 2014, Capítulo <1231>, la cual establece límite de alerta de 100 UFC/mL para aerobios mesófilos, mohos y levaduras y ausencia de patógenos. Para el control microbiológico del agua, a la red se le realiza sanitización semanal con el desinfectante de rotación y se efectúa mantenimiento de las resinas que consiste en la regeneración de las mismas cada 8 días.

El análisis de ambiente de las áreas de fabricación se realiza una vez por semana rotando las áreas; los resultados de febrero a abril de 2017, se encuentran dentro de los parámetros microbiológicos establecidos por laboratorios Lissia. Este análisis resulta de suma importancia para el laboratorio ya que permite generar trazabilidad con los lotes al momento de ser fabricados y envasados y conocer así las condiciones ambientales (desde el punto de vista microbiológico) en cual se realizó la operación.

Para análisis de equipos y superficie se evidenció un resultado fuera de la especificación interna en febrero en el Mesón 1 (de dispensación). En este caso se procedió a reportar el resultado como No conforme, realizar sanitización de la superficie y realizar seguimiento al Lote que se estaba dispensando al momento del análisis.

El análisis de operarios se realiza principalmente para evaluar las Buenas Prácticas de Manufactura, las cuales en el caso del personal, involucra una correcta desinfección de las manos, guantes y peto. En los resultados reportados se evidencia que en febrero fue donde se evidenció mayor porcentaje de operarios fuera de la especificación interna microbiológica para aerobios mesófilos; posterior a los análisis se tomó como medida la concientización, sensibilización y capacitación del personal sobre el correcto lavado de manos y la

desinfección de sus elementos como guantes y petos cada 15 minutos, de esta manera como se evidenció en las gráficas se logró una disminución del porcentaje de operarios fuera de especificación de un 36,3% a un 0% desde febrero a abril de 2017.

9. CONCLUSIONES

Se logró evaluar el comportamiento de las tres cepas ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Escherichia coli*** con las tres matrices crema para manos y cuerpo Q10, jabón líquido avena y talcos corporales, determinando la recuperación de ***Staphylococcus aureus*** en talco corporal, lo que no sucedió con ***Pseudomonas aeruginosa*** ni ***Escherichia coli***. Con la crema para manos y cuerpo Q10 la recuperación fue mayor para ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Escherichia coli***; en cuanto a la matriz, jabón líquido avena, no fue posible recuperar ***Staphylococcus aureus***.

Se obtuvo crecimiento en algunos ensayos pero no fue posible establecer porcentaje de recuperación para las tres cepas en las diferentes matrices en relación con la capacidad neutralizante del caldo Lethen y con el agua Peptona, ya que fue evidente que los porcentajes de recuperación no superaron el 10%.

El caldo Lethen fue “eficiente” para neutralizar el conservante frente a ***Staphylococcus aureus*** en talcos corporales, para ***Pseudomonas aeruginosa*** en crema para manos y cuerpo Q10 y jabón líquido avena y para ***Escherichia coli*** en crema para manos y cuerpo Q10. Se presentó una recuperación en caldo Lethen y agua Peptona en los ensayos con ***Staphylococcus aureus*** en crema para manos y cuerpo Q10 y ***Escherichia coli*** en jabón líquido avena. Para los ensayos de talcos corporales con ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Escherichia coli*** y para jabón líquido avena con ***Staphylococcus aureus*** no hubo recuperación bacteriana.

A través de este ensayo se comprobó que el método tradicional de siembra fue efectivo en comparación con el método rápido de Petrifilm; a pesar de esto, se logró verificar que Petrifilm es un método rápido diseñado para incrementar la

productividad, fiabilidad y eficiencia, pero para este ensayo con productos cosméticos su eficacia fue nula.

En cuanto a las actividades complementarias, los resultados del análisis a los diferentes puntos de agua establecen, que los puntos analizados de febrero hasta Abril 2017, cumplieron con los parámetros establecidos por el Laboratorio Lissia.

Con relación a los resultados del análisis microbiológico de operarios, ambientes, superficies y equipos que se comparten desde Febrero hasta Abril del 2017, se evidencia que en su mayoría se encuentran dentro de las especificaciones establecidas; cuando se comprobaron desviaciones, las cuales no fueron críticas, se tomaron acciones correctivas y preventivas que consistieron en realizar sanitizaciones en superficies y capacitaciones al personal, las cuales fueron efectivas y se demuestran con la disminución de las desviaciones en los siguientes meses (marzo y abril).

Los parámetros evaluados en las actividades complementarias descritas en el presente informe son de suma importancia para garantizar el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura en Laboratorios Lissia.

10. RECOMENDACIONES

Se sugiere contar con un patrón de McFarland y su verificación por espectrofotometría para tener más claridad al momento de emitir los resultados.

Además se recomienda hacer más ensayos con las dos técnicas de siembra, profundidad y Petrifilm para poder confirmar cuál de las dos es más exacta en la recuperación de microorganismos.

Seguir evaluando el caldo Letheen con otros microorganismos como son mohos y levaduras para en un futuro hacer una validación de este método.

En futuros ensayos con productos cosméticos donde los conservantes tienen un amplio espectro se debe tener en cuenta la dilución del producto para que el número de microorganismos a inocular se puedan recuperar según la USP.

11. GLOSARIO

Aerobios mesófilos: los microorganismos aerobios mesófilos son la biota total compuesta por bacterias, mohos filamentosos y levaduras, aerobios estrictos o facultativos que presentan unas características térmicas intermedias. Crecen en un rango de temperatura entre 15 – 45°C, con un óptimo de 35°C (excepto mohos filamentosos y levaduras), siendo la mínima de 15°C a 20°C y la máxima de 45°C.

Actividad bactericida: capacidad de un producto de reducir el número de células bacterianas viables de cepas representativas.

Agentes Neutralizantes: los agentes neutralizantes pueden usarse para neutralizar la actividad de los agentes antimicrobianos.

Bactericida: producto que mata las bacterias vegetativas con condiciones definidas.

Coliformes: este grupo de microorganismos comprende varios géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, capaces de fermentar la lactosa a 35°C con producción de gas, están ampliamente difundidos en la naturaleza y agua. Dentro de los coliformes totales se distinguen dos tipos, por un lado los coliformes fecales que provienen del tracto intestinal de animales de sangre caliente y por el otro lado los coliformes que residen de forma natural en el suelo y agua.

Conservante: una o varias sustancias que pueden ser adicionadas a los productos cosméticos, en especial a las preparaciones de base acuosa, con el objeto de evitar la proliferación o limitar la contaminación microbiana que en condiciones normales de almacenamiento y uso, pueden resultar en: riesgo de infección para el consumidor o deterioro del producto.

Dilución de la muestra: dilución de la suspensión inicial.

Estéril: ausencia de todos los organismos vivos y de virus.

Ensayo/ prueba: determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento.

Especificaciones: documento que establece requisitos.

Hongos: microorganismos eucarióticos que se observan como colonias grandes y planas, con bordes difusos, colores variables, y usualmente presentan núcleo central.

Levaduras: son hongos unicelulares de forma oval o cilíndrica que forman pequeñas colonias de bordes definidos, pueden ser tridimensionales y usualmente aparecen sin centro.

Materia prima: toda sustancia de calidad definida empleada en la fabricación de un producto cosmético.

Mohos y levaduras: son microorganismos eucarióticos, distribuidos ampliamente en el ambiente y que se pueden encontrar como biota normal de un alimento, o como contaminantes en equipos mal sanitizados. Los mohos toleran y se desarrollan en concentraciones de acidez relativamente elevadas, pero el pH óptimo para casi todas las especies es de 5,6. Su rango de temperatura óptima de crecimiento es de 22 – 30°C.

Muestra: cantidad de unidades o partes de un todo, extraída con criterio racional, para asegurar que la misma representa el material a utilizar.

Muestreo: Proceso mediante el cual se adquiere una pequeña parte representativa de un lote con el propósito de tomar una decisión de aceptar o rechazar el lote entero.

Purga: lavado preliminar que se realiza a los instrumentos y equipos con la misma sustancia que posteriormente van a contener.

Producto cosmético: se entenderá por producto cosmético toda sustancia o formulación de aplicación local al ser usada en las diversas partes superficiales del

cuerpo humano: epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos o en los dientes y las mucosas bucales, con el fin de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto y protegerlos o mantenerlo en buen estado y prevenir o corregir los olores corporales.

Producto a granel: todo producto que ha completado todas las etapas del procesamiento, hasta el envasado final, pero sin incluir este último.

Producto intermedio: material parcialmente procesado que debe someterse a otras etapas de la fabricación antes de que se convierta en producto a granel.

Producto terminado: producto que ha sido sometido en todas las etapas de fabricación, incluyendo el envasado en el contenedor final y el etiquetado.

Sanitización: empleo de agentes químicos para eliminar microorganismos llegando casi a niveles de esterilidad.

Suspensión inicial: suspensión (o solución) de una muestra en un volumen definido de un líquido apropiado (diluyente, neutralizante, caldo o combinación de éstos).

Tensoactivo: Son sustancias que presenta actividad en las superficies reduciendo la superficie del líquido en el que esta disuelto o bien la tensión superficial de la interfase si es que hubiera otra fase presente.

12. BIBLIOGRAFÍA

Alonzo, et al, .2008. Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el Mercado y placas de Petrifilm™ 3M™ para el análisis de alimento. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencia. Bogotá D.C 2013. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis230.pdf>

Arthur K. 2000. Handbook of Pharmaceutical Excipients. American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press. Third Edition. Pág. 340-342, 450-452,510.

Ascenzi J. 1996. Handbook of disinfectants and antiseptics. New. Your. Marcel Kekker. Disponible en:

<https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=tFPW4D70BmgC&oi=fnd&pg=PR3&dq=Ascenzi.+L.+1996.+Handbook+of+disinfectants+and+antiseptics&ots=pJ4nXuo5fu&sig=ixZKrPYq-4E2T-KRY2Q9aHMnVtM#v=onepage&q&f=false>

Battista, et al, .2000. Evaluación del método Petrifilm para la determinación del recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales, en drogas vegetales. Universidad Nacional de Misiones. Argentina 2000. Disponible en: <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/205.pdf>

Bravo, Z 2016. Estrategias de supervivencia de *Acinetobacter baumannii* en el ámbito hospitalario Leioa España.

Carrillo, et al, .2007. Manual de Microbiología de los alimentos. Bacterias. Capítulo 2 p 19 San Salvado de Jujuy 2007. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/>

Cerra, et al, .2013.Manual De Microbiología Aplicada A Las Industrias Farmacéutica, Cosmética Y De Productos Médicos ISBN 978-987-26716-3-1. Publicado y editado en Buenos Aires Año 2013.Disponible en: <http://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>

FDA Validación de Procesos: Principios y Prácticas Generales 2001. Disponible en:http://www.pharmatechespanol.com.mx/articulo/500.nueva_guia_de_validacion_de_procesos_de_la_fda_reaccion_de_la_industria_preguntas_y_retos

García, et al., 2015.Evaluación de seguridad y test de eficacia de los conservantes del "Champú Preventivo Junior RF".Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Alcalá. Facultad de Medicina. Madrid, España 2015.Disponible en: <http://www3.uah.es/dianas/journal/wp-content/uploads/2015/09/dianas.20150902.arbeteta.pdf>

Guía de Estabilidad de productos Cosméticos/ Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. 1 ed. Brasilia: ANVISA, 2004.Disponible en: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Gu%C3%ADa+de+Estabilidad+de+Productos+Cosm%C3%A9ticos/dd40ebf0-b9a2-4316-a6b4-818cac57f6de>

GTC 77 (INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN).Guía para determinar la efectividad de conservantes en formulaciones cosméticas. Primera actualización. Bogotá (ICOTEC). 2002.

Hernández, .2006. Aportaciones al estudio de la actividad antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Ciencias. Barcelona. 2006. Disponible en: <https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2006/tdx-0601107-162233/ahr1de1.pdf>

ISO 18415 (INTERNATIONAL STANDARD). Cosmetics Microbiology. Detection of specified and non-specified microorganisms. First edition 2007-09-01. 2007.

ISO 11930 (INTERNATIONAL STANDARD). Cosmetics Microbiology. Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product. First edition 2012-04-01.2013.

ISO 21148 (INTERNATIONAL STANDARD). Cosmetics Microbiology. General instructions for microbiological examination: First edition 2005-10-15 2005.

Marín J, et al., 2008.Evaluación del Método dilución neutralización aplicado a un desinfectante según la Norma Técnica Colombiana 5473 de 2007.Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencia. Bogotá D.C 2008.Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis111.pdf>

Merck., 2007. Manual de Medios de Cultivo.

NTC 4833(Norma Técnica Colombiana). INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Industria de cosméticos y de tocador. Métodos de ensayo microbiológicos para productos cosméticos. Primera actualización. Bogotá (ICONTEC). 2004.

NTC 5150 (INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN).Antisépticos y Desinfectantes Químicos. Actividad Bactericida Básica. Método de Prueba y Requisitos (fase 1).Primera actualización. Bogotá (ICONTEC).2003.

RAPEX Sistema Europeo de Alertas Rápidas para productos peligrosos. Disponible en : <http://mccamps.com/wp-content/uploads/2017/05/informe-rapeX-7-4-2017.png>

RESOLUCION 2115. LOS MINISTERIOS DE LA PROTECCION SOCIAL Y DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Por medio de la cual se

señalan las características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano.2007. Disponible en: http://www.minambiente.gov.co/images/GestionIntegraldelRecursoHidrico/pdf/Le_gislaci%C3%B3n_del_agua/Resoluci%C3%B3n_2115.pdf

Schülke & Mayr, Ficha técnica laboratorios Lissia.

SECRETARIA GENERAL DE LA COMUNIDAD ANDINA. Obtenido de modificación de la Resolución 1418: Limite de contenido microbiológico de productos cosméticos. Disponible en: https://www.invima.gov.co/images/resolucion_1482.pdf

USP 37- NF 32 FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, 2014.

Ortiz, .2008. Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado elaborado en una industria farmacéutica. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencia. Bogotá D.C 2008. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis109.pdf>