

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE COSMÉTICOS  
PARA BEBÉS ELABORADOS POR LA INDUSTRIA GUATEMALTECA”**

Informe de Tesis

Presentado por

Ligia María Guerra Bone

Para optar al título de

Química Bióloga

Guatemala, octubre de 2003

## **JUNTA DIRECTIVA**

M. Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Lic. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Dr. Federico Adolfo Richter Martínez	Vocal III
Br. Carlos Enrique Serrano	Vocal IV
Br. Claudia Lucía Roca Berreondo	Vocal V

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE COSMÉTICOS  
PARA BEBÉS ELABORADOS POR LA INDUSTRIA GUATEMALTECA”**

Ligia María Guerra Bone  
Química Bióloga

Guatemala, octubre 2003

---

Ligia María Guerra Bone  
Tesisista

---

Lic. Emilio García Fuentes  
Asesor

---

Licda. Amanda Gálvez de Matheu  
Revisora

---

Licda. Alba Marina Valdés de García  
Directora de Escuela

---

M. Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán  
Decano

## ÍNDICE

I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	3
III. Antecedentes.....	4
A. Definición de cosmético.....	4
B. Cualidades que debe cumplir un cosmético.....	5
C. Composición general de los productos cosméticos.....	5
D. Clasificación de los productos cosméticos.....	7
E. Origen de la contaminación.....	11
F. Importancia clínica de la contaminación.....	13
G. Parámetros de calidad microbiológica.....	16
H. Metodologías de análisis microbiológicos.....	18
I. Laboratorios productores de cosméticos en Guatemala.....	21
IV. Justificación.....	22
V. Objetivos.....	23
VI. Hipótesis.....	24
VII. Materiales y Métodos.....	25
VIII. Resultados.....	34
IX. Discusión de Resultados.....	41
X. Conclusiones.....	44
XI. Recomendaciones.....	45
XII. Referencias.....	46
XIII. Anexos.....	49

## I. RESUMEN

En Guatemala se consumen productos cosméticos para bebés con el fin de brindar bienestar y limpieza a los niños, sin embargo no existe la educación en la población para verificar la calidad microbiológica de los mismos al momento de la compra, por lo que se corre el riesgo de adquirir productos contaminados ya que en el país existen industrias que producen estos cosméticos sin que se indique al consumidor sobre la calidad de los mismos.

En base a lo anterior, se realizó esta investigación, a fin de proporcionar a la población la información necesaria referente a la calidad microbiológica e inocuidad de algunos productos cosméticos para bebés de fabricación guatemalteca. Los principales objetivos del estudio fueron evaluar la calidad microbiológica de estos productos y aplicar diversas técnicas bacteriológicas al análisis de cosméticos. Por medio de la evaluación microbiológica se buscaba determinar la inocuidad de los productos muestreados para el consumidor final así como detectar fallas en los sistemas de calidad de las empresas guatemaltecas que se incluyeron en el muestreo.

Para la realización de esta investigación se llevó a cabo un muestreo no probabilístico que incluyó cinco marcas de cosméticos para bebés producidos por la industria guatemalteca y que a su vez se encuentran a la venta en un supermercado de la ciudad capital, la muestra quedó conformada por diecinueve productos cosméticos.

El análisis se realizó en el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos LAFYM, perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos, siguiendo el procedimiento analítico

aceptado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos de América, con el fin de determinar si los productos cumplían con los requisitos microbiológicos del Laboratorio Nacional de Salud.

El análisis inició con la preparación de dos diluciones decimales de las muestras, las cuales se realizaron utilizando Caldo Letheen modificado. Luego ambas diluciones fueron sembradas en medios enriquecidos y en medios selectivos.

Los resultados reflejaron que de las diecinueve muestras, solamente una evidenció crecimiento bacteriano, pero la bacteria encontrada en dicha muestra no era patógena ni de alta virulencia, además el recuento se encontraba dentro de los límites aceptados por el Laboratorio Nacional de Salud, por lo que todas las muestras analizadas cumplen con los parámetros de calidad microbiológica y no representan riesgo de infección bacteriana o fúngica.

## II. INTRODUCCIÓN

Los productos cosméticos son compuestos que debido a su función tienen contacto directo con las diversas partes superficiales del cuerpo humano, así como con dientes y mucosas, por lo que deben cumplir con estrictos parámetros de calidad microbiológica, toxicológica y fisicoquímica. Más aún si dichos productos están dirigidos a bebés y niños de corta edad, ya que deben estar libres de patógenos de alta virulencia y los recuentos microbianos deben ser bajos.

Mediante la evaluación microbiológica de los productos cosméticos puede estimarse la carga de microorganismos presentes en dichos productos, así como determinar fallas en los sistemas de control de calidad. El análisis completo incluye la identificación y numeración de patógenos tales como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* sp., *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El análisis es completo al investigar la presencia de mohos y levaduras.

Según una encuesta realizada por el Laboratorio de Análisis Fisicoquímicos y Microbiológicos –LAFYM- de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, hasta el año 2001 se encontraban registrados 37 laboratorios guatemaltecos productores de cosméticos, con base en ello se tomaron cinco de estas marcas para analizar de los siguientes productos: champú, aceite, crema, talco y colonia sin utilizar duplicados para el análisis. Con esto se logró un estudio en el cual se incluyeron diecinueve muestras de productos cosméticos correspondientes a diferentes marcas expandidas en un supermercado de la Ciudad de Guatemala.



### III. ANTECEDENTES

#### A. DEFINICIÓN DE COSMÉTICO:

Los productos cosméticos son sustancias o preparados destinados a ser puestos en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso o capilar, uñas, labios, etc.) o con dientes y mucosas con el fin de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos o mantenerlos en buen estado, sin afectar la estructura o función del cuerpo (1).

La administración federal de Alimentos, Drogas y Cosméticos de los Estados Unidos (FDA) define a los cosméticos como artículos dirigidos a ser aplicados para la limpieza, embellecimiento o promotores de atractivos o modificaciones a la apariencia del cuerpo humano sin provocar afecciones a la estructura del organismo o sus funciones. Esta definición incluye cremas para el cuidado de la piel, lociones, talcos, spray, perfumes, lápiz labial, barniz de uñas, maquillajes faciales y para los ojos, permanentes, tintes para el cabello, desodorante, productos para bebés, aceites de baños, geles de baño, así como cualquier material cuyo uso esté encaminado a ser un componente de productos cosméticos (2).

Algunos productos también pueden ser medicamentos si tienen el propósito de curar, mitigar, tratar o prevenir alguna enfermedad. Ejemplos típicos los constituyen las pastas de dientes, los desodorantes antitranspirantes o las cremas de protección solar y algunos otros cosméticos medicados.

## B. CUALIDADES QUE DEBE CUMPLIR UN PRODUCTO COSMÉTICO:

Cualquier formulación cosmética debe cumplir con cinco características básicas:

- Respetar la integridad de la piel
- Mantener su pH fisiológico o permitir un rápido retorno a la normalidad.
- Ser bien tolerada y de una perfecta inocuidad toxicológica y microbiana para quien la utilice.
- Tener una textura agradable.
- Ser de fácil utilización (3).

## C. COMPOSICIÓN GENERAL DE LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS:

Un producto cosmético se compone de cuatro elementos básicos:

### 1. Excipiente:

La función de un excipiente es servir de soporte del o de los principios activos. La composición del excipiente permitirá la penetración del activo a través de la piel. Algunos excipientes favorecen una acción exclusivamente superficial, mientras que otros permiten la difusión de los activos a través del estrato córneo, hasta nivel dérmico, etcétera.

### 2. Principios activos:

Los principios activos son los responsables de la eficacia del producto cosmético. Algunos ejemplos son el colágeno como hidratante, el alumbre como astringente, los cinamatos como filtros solares, etcétera.

### 3. Coadyuvantes:

Estos compuestos son indispensables en los productos cosméticos pues actúan como conservadores, estabilizantes y humectantes. Los conservadores son antisépticos y antioxidantes, los estabilizantes son gelificantes y espesantes y los humectantes son sustancias añadidas con el fin de evitar que la preparación pierda agua. Los coadyuvantes cuya función es prevenir la alteración química o microbiológica son de gran importancia, ya que muchas de las sustancias utilizadas en la fabricación de cosméticos son susceptibles a la degradación biológica por microorganismos.

Los individuos normalmente sanos poseen considerable resistencia a la infección por bacterias y hongos normalmente localizados en su piel y medio ambiente habitual, pero en individuos sensibles, por ejemplo los recién nacidos, ancianos, enfermos o personas en tratamiento terapéutico, existe una probabilidad mayor de desarrollo de infecciones. Por lo tanto, los conservantes se añaden a los cosméticos por dos razones: primero, para evitar su deterioro, es decir para prolongar la vida comercial del producto y segundo, para proteger al consumidor de la posibilidad de infección (4).

Un conservante es una sustancia antimicrobiana que se añade a un producto en cantidades muy pequeñas (entre 0,0007% y 1% del principio activo, dependiendo del producto) durante el proceso de fabricación. Está diseñado para proteger a los productos frente a la contaminación por microorganismos durante la fabricación, almacenaje y uso cotidiano (5).

Los preservantes no deben emplearse con el fin de eliminar microorganismos que provienen de materia prima de baja calidad o cuyo proceso de producción es deficiente, ya que con ello se violarían las normas de procedimientos de operación, basadas en las Buenas Prácticas de manufactura.

Idealmente, un preservante debe poseer las siguientes características:

- Excelente actividad contra todos los microorganismos que puedan afectar al producto.
- No debe ser tóxico ni debe irritar la piel del consumidor.
- Debe ser estable, para poder resistir los procesos de producción, así como la vida útil del producto.
- No debe ser inhibido por los ingredientes de la formulación sobre la cual se añadirá (6).

#### 4. Aditivos:

Los aditivos más comunes son los perfumes y los colorantes, que unas veces son facultativos y otras son imprescindibles (3). Las materias aromáticas son sustancias formadas por moléculas volátiles que permiten la percepción de un olor.

#### D. CLASIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS COSMÉTICOS:

En función de sus propiedades cosmetológicas, los cosméticos pueden clasificarse en:

- Productos de tocador y de higiene de la piel y faneras.
- Productos de maquillaje.

- Productos de coloración y decoloración usados en tratamientos cosméticos.
- Depilatorios.
- Perfumes.
- Productos solares.

En cuanto al grupo etéreo a quien están dirigidos los productos cosméticos, pueden clasificarse en:

- Productos para bebés y niños de corta edad, incluyendo productos de higiene personal.
- Productos para jóvenes, en especial de uso facial.
- Productos para personas adultas y ancianos, en especial humectantes de la piel (3).

Los productos cosméticos para bebés incluyen polvos, aceites, lociones, cremas, pomadas para alergias, champús y jabones.

En esta sección se tratará sobre los productos dirigidos a bebés y niños de corta edad. El término "bebé" se utilizará para designar a aquellos niños comprendidos entre las dos semanas después del nacimiento y el primer año de vida (7).

Muchos estudios han determinado que la piel de los bebés es muy diferente histológica y fisiológicamente a la de los adultos, ya que es mucho más delgada, contiene menos estrato córneo y menos vellos. El estrato córneo es delgado debido a que las estructuras de soporte están parcialmente desarrolladas. En general, la piel de los recién nacidos y bebés es mucho más

susceptible a las irritaciones e infecciones debido especialmente a que el sistema inmunológico no se encuentra totalmente desarrollado (4). Es por ello que el cuidado apropiado de la piel de los bebés en los hospitales así como en casa constituye un importante problema pediátrico (7).

Actualmente se encuentran a la venta diversos productos cosméticos y de aseo personal para bebés, los cuales deben garantizar estar exentos de bacterias en el momento de su comercialización y contener sistemas de preservación adecuados para prevenir la contaminación accidental durante su uso.

#### 1. ACEITES:

Estas preparaciones están compuestas por aceite mineral y aceites vegetales usados separadamente o en combinación. Algunos aceites contienen hexaclorofeno como antiséptico y un antioxidante como el tocoferol para retardar la rancidez de los aceites. Se utilizan para limpiar la piel del bebé así como las superficies expuestas al roce del pañal y sirven como lubricantes, también actúan como una barrera hidrofóbica contra la orina (7).

#### 2. LOCIONES:

Las lociones son soluciones de agua y alcohol utilizadas para cubrir la piel con una película delgada que actúa como fuente de hidratación (3). Las lociones para bebés están formuladas para prevenir la aparición de rash, proveer un olor agradable a la piel del bebé, suavizar e hidratar la piel y prevenir la fricción y consecuente irritación (8).

### 3. CREMAS:

Las cremas consisten básicamente de emulsiones producidas por la mezcla y agitación vigorosa de dos líquidos de diferentes características a fin de unirlos en pequeños glóbulos o partículas que serán mantenidos en suspensión por la adición de un agente emulsificante (4). Las cremas para bebés tienen una alta proporción de aceite, lo cual provee de lubricación y humectación a la piel. Son aplicadas generalmente después del baño para prevenir daños en la piel ocasionados por cambios de temperatura y humedad (7).

También existen cremas medicadas, conocidas como "pomadas" las cuales contienen óxido de cinc, antisépticos, fungicidas, antibióticos, vitaminas y ácidos grasos. Estas cremas son utilizadas para prevenir las irritaciones provocadas por el uso del pañal, en especial por el uso del pañal desechable (8).

### 4. POLVOS:

Los polvos son productos en forma sólida muy fina que fluye libremente, son inocuos y absorbentes. Pueden contener perfume y en ocasiones algún ingrediente medicado. Los polvos para bebés se aplican sobre la piel y aceleran la evaporación de la transpiración, proveen de agentes lubricantes cuando son aplicados en el cuello y axilas y evitan la irritación en áreas de contacto con el pañal (7, 8).

## 5. CHAMPÚ:

El champú es una mezcla de agentes emulsionantes y detergentes que actúan sobre el cuero cabelludo con el fin de limpiarlo, eliminar el exceso de grasa y preservar la elasticidad y salud del pelo. En los champúes para bebés el requerimiento fundamental es proporcionar suavidad al cabello sin resecar el cuero cabelludo. La suavidad se logra seleccionando agentes tensoactivos no irritantes que proporcionen detergencia limitada (4).

## E. ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN:

Según un informe de la Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos, FDA, no se supone que los cosméticos estén totalmente libres de microorganismos cuando se usan por primera vez. Tampoco que permanezcan libres de ellos mientras los usa el consumidor. Cada vez que se abre un paquete nuevo los microorganismos que están en el aire llegan al producto. Sin embargo, aquellos productos que tienen los preservantes adecuados eliminan estos microorganismos y permiten que el producto sea seguro (9). Normalmente el origen de la contaminación de los productos nuevos proviene de alguna o algunas de las siguientes fuentes:

1. Materia prima
2. Medio ambiente
3. Equipo utilizado durante su fabricación
4. Material de envase primario
5. Personal que manipula el producto



La materia prima es de gran importancia, ya que para la elaboración de muchos productos cosméticos la materia prima incluye productos derivados de origen animal, tales como extractos de órganos, placenta, hígado, glándulas mamarias, corazón, y otros ingredientes que son encontrados en tejidos animales, tales como glucosaminas, lípidos bovinos, proteínas, aminoácidos y más recientemente esfingolípidos aislados del sistema nervioso. Estos tejidos se encuentran expuestos a la microbiota normal de los animales a los cuales se les extrajeron, así como a la microbiota contaminante de otros órganos como intestinos o piel, por lo que deben ser esterilizados antes de su uso a nivel cosmético (10).

Las materias primas son de gran importancia para un producto cosmético, por lo cual deben estar libres de microorganismos y de sustancias químicas indeseables, deben ser estables a luz y calor, ser resistentes a la oxidación del aire y con características químicas y físicas constantes y reproducibles. Con frecuencia los productos naturales son más propensos a la proliferación microbiana. Los extractos de plantas pueden contener esporas microscópicas que pueden llegar a germinar en el producto final. Incluso el agua, que es uno de los ingredientes más extensamente usados, es responsable de más del 90% de todos los casos de contaminación (11).

El medio ambiente y el equipo influyen en gran medida, ya que dentro de la planta de producción de cosméticos deben guardarse las más estrictas medidas de higiene y desinfección pues la contaminación puede ser introducida por prácticas deficientes en la sanitización y limpieza de las áreas por donde se maneja tanto la materia prima como el producto terminado.

Por muy cuidadosamente que se elaboren los cosméticos y artículos de tocador, por naturaleza el producto final contendrá pequeñas cantidades de microbios que, bajo ciertas condiciones, pueden multiplicarse rápidamente (11).

Es importante destacar que un estricto control de las buenas prácticas de manufactura evitará que la contaminación sea introducida a un producto a través de la manipulación que lleva a cabo el personal, para esto es necesario cumplir con monitoreo de manos y llevar un estricto control del personal que está autorizado para ingresar a la planta de producción (4).

#### F. IMPORTANCIA CLÍNICA DE LA CONTAMINACIÓN:

Aunque el riesgo de llegar a enfermar a raíz de cosméticos o artículos de tocador contaminados es muy bajo, las bacterias presentes en estos productos pueden provocar irritaciones o infecciones, especialmente si el producto entra en contacto con piel lesionada (11).

Cerca del 2 al 4 % de las consultas dermatológicas son debidas a dermatitis causadas por cosméticos. Las reacciones adversas afectan no solo la piel en forma de irritación o descamación sino también como conjuntivitis, asma, urticaria, angioedema o neumonía (12).

Según información de la FDA, agencia que también regula los cosméticos, es raro que se reporten daños serios causados por cosméticos, aunque se siguen registrando casos como infecciones de ojos, alergias y problemas de irritación de la piel. Dentro de las infecciones de la piel se pueden mencionar piodermias, foliculitis, ectima, candidiasis y la dermatitis atípica. Los agentes bacterianos que se asocian comúnmente con estos

cuadros patológicos son principalmente *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (9, 13).

La contaminación microbiológica en productos cosméticos, para el baño y el cuidado personal ha constituido una gran preocupación en la industria por muchos años. Bacterias, levaduras u hongos, todos causan descomposición microbiológica. Todos son extremadamente diversos en sus actividades metabólicas y estas reacciones metabólicas pueden causar problemas de salud debido a que la degradación del producto puede ser tóxica o mutagénica (14).

Varios microorganismos producen sustancias de desecho tóxico que hacen que el producto no sea adecuado y peligroso si crece bajo ciertas condiciones que ayudan a la producción de toxinas. Las endotoxinas, producidas por las bacterias Gram negativo, no son necesariamente desactivadas por esterilización, ya que son estables al calor. Para seleccionar un sistema de protección microbiológico aceptable para uso en un producto cosmético, el fabricante debe estar familiarizado con la composición, morfología, ecología y diversidad de los microorganismos y sus influencias en la vida diaria. Este conocimiento le permitirá interpretar el mecanismo de acción del organismo involucrado y resolver eficientemente la contaminación resultante (14).

Los microorganismos Gram negativo, en particular *Pseudomonas*, parecen ser los microorganismos más frecuentemente aislados en los cosméticos. Aunque también pueden verse contaminados con frecuencia por estafilococos, difteroides, hongos y levaduras. Ciertos preparados cosméticos,

tales como cremas y lociones son ampliamente utilizados en los hospitales, y ya que los pacientes son probablemente más sensibles a las infecciones que los individuos sanos, el estado microbiológico de estos cosméticos pueden tener importantes implicaciones. Quizá el ejemplo más sorprendente de esto fue la investigación realizada por Morse *et. al.* de un brote de septicemia causado por *Klebsiella pneumoniae* en una unidad de cuidados intensivos de un hospital, el origen de la cual resultó ser un frasco de crema de manos con lanolina contaminada (7).

Como pueden confirmar los dermatólogos, el riesgo de infecciones cutáneas originadas por bacterias patógenas, que puedan multiplicarse en productos cosméticos y de cuidado para la piel indebidamente conservados, puede representar un riesgo más serio para la salud que las reacciones alérgicas (11).

Es por ello que para aprobar y considerar un producto cosmético como apto para el uso o consumo humano, se requiere la comprobación de las características microbiológicas, así como de las características físicas, químicas y toxicológicas (15).

La habilidad de los microorganismos para crecer y reproducirse en cosméticos ha sido estudiada por muchos años, y se sabe que esta contaminación puede producir cambios químicos en los productos, así como daños al consumidor. Los métodos de aislamiento e identificación de microorganismos en cosméticos son el recuento total de colonias y los cultivos de enriquecimiento. También se llevan a cabo diluciones y plaqueo en medios selectivos que inactiven los agentes de preservación comúnmente utilizados en

la fabricación de cosméticos. Los microorganismos aislados se identifican por métodos microbiológicos de rutina o por kits comerciales de identificación similares a aquellos empleados en microbiología clínica (1, 15).

#### G. PARÁMETROS DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA:

En Guatemala no existen parámetros de cumplimiento obligatorio respecto a los niveles permisibles de bacterias en productos cosméticos, sin embargo se trabaja con base en los niveles adoptados por el Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala. Esta institución trabaja los cosméticos como productos farmacéuticos no estériles y permite los siguientes recuentos microbianos aceptados por la Farmacopea de los Estados Unidos y por FDA:

Productos para el área de los ojos.....<500 UFC/g ó mL

Productos para fuera del área de los ojos.....<1000 UFC/ g ó mL

*Staphylococcus aureus*..... Ausencia

*Pseudomonas aeruginosa*..... Ausencia

*Escherichia coli*..... Ausencia

*Clostridium sp*..... Ausencia (16).

La Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA), recomienda el análisis microbiológico, fisicoquímico y toxicológico de los productos cosméticos. El examen microbiológico incluye la dilución y el plaqueo con medios de cultivo que inactiven los preservantes utilizados en la fabricación, luego se realiza el recuento total, la investigación de mohos y

levaduras, el recuento e identificación de *S. aureus* y el recuento de microorganismos anaerobios (15).

El parámetro adoptado por MERCOSUR en cuanto a la calidad microbiológica de los productos cosméticos para uso infantil es que dichos productos deben poseer recuentos de microorganismos mesófilos aerobios inferiores a 10<sup>2</sup> UFC/g ó mL, con un límite máximo de 510 UFC/g ó mL. Además, deben estar ausentes por gramo o mililitro de muestra: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, coliformes totales y fecales y clostridios sulfito reductores, estos últimos exclusivamente para talcos (17).

En Cuba, se lleva a cabo una evaluación sanitaria anual de los productos cosméticos producidos a nivel local y de importación. Dicha evaluación incluye el análisis microbiológico, el cual comprende el conteo total de microorganismos aerobios mesófilos, el conteo de coliformes y la identificación de *Clostridium perfringens*. Los resultados publicados hasta 1999 determinaron que de los productos elaborados en la isla, el 0.6% presentó contaminación bacteriana, siendo los principales productos contaminados las cremas elaboradas a base de fango (18).

En el caso de Guatemala, se cuenta con la norma COGUANOR 30 023, la cual incluye las especificaciones y características que debe cumplir el polvo de talco para bebés y niños de corta edad producido en el país o en el extranjero para ser utilizado como materia prima en la elaboración de talco para bebés (19). Los criterios microbiológicos que incluye esta norma son los siguientes:

Recuento de microorganismos aerobios mesófilos en placa...	<500 UFC/ g
Microorganismos anaerobios .....	0 UFC/ 10g
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	0 UFC/ 10g
Bacterias coliformes.....	0 UFC/ 10g
<i>Salmonella</i> sp. ....	0 UFC/ 10g
<i>Pseudomonas</i> sp. ....	0 UFC/10g

#### H. METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO:

El primer análisis microbiológico que se lleva a cabo es el conteo directo de colonias aisladas del medio de cultivo Lethen modificado, el cual debe ser empleado en forma de caldo para la elaboración de diluciones y en forma de agar sólido para los recuentos (15).

El medio Lethen modificado está constituido por agar tripticasa soya que es un medio nutritivo; lecitina que actúa como un agente inhibidor de compuestos de amonio cuaternario utilizados como preservantes; polisorbato 80 (tween 80) que anula los compuestos fenólicos, hexaclorofenos y formalina (20). El tween 80 y la lecitina neutralizan al alcohol etílico, favoreciendo el crecimiento bacteriano en las muestras que se encuentren contaminadas.

Las diluciones decimales recomendadas por la FDA se realizan a partir de una porción de 1 gramo o 1 mililitro de la muestra añadida a 9 mililitros de caldo Lethen modificado. Si el cosmético es sólido, polvo, cremoso o aceitoso se recomienda la adición de 1 mililitro o gramo de la muestra a un tubo con 8 mililitros de caldo más 1 mililitro de tween 80.

El recuento aeróbico se realiza por la técnica de esparcido, ya que esta técnica facilita el reconocimiento de diferentes tipos de colonias así como el recuento diferencial. La técnica de esparcido consiste en agregar de 0.1 a 0.5 mililitros de cada dilución a una caja de Petrie conteniendo el medio de cultivo previamente desecado en la incubadora a 37 °C, luego la muestra se esparce por la superficie del medio utilizando una varilla de vidrio estéril en forma de L. El recuento se realiza en agar Lethen modificado y también puede utilizarse agar Vogel Jonson si se sospecha de *Staphylococcus* spp. Se deben preparar duplicados en cajas de Petrie de cada dilución preparada. Las diluciones decimales que se siembran también pueden ser elaboradas agregando 5 ó 10 gramos o mililitros del cosmético a 45 ó 90 mililitros de caldo Lethen (15).

Se deben contar las colonias encontradas en las cajas que contengan entre 30 y 300 colonias y registrar los resultados por dilución. El número de colonias se multiplica por el factor de dilución, reportando los resultados como Unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo o mililitro de muestra. Si las cajas no presentan crecimiento se reporta únicamente como menor de la dilución más baja sembrada.

Para las cajas que contienen agar Vogel Jonson, se deben buscar colonias convexas, negras, brillantes con o sin un halo claro alrededor. Para demostrar la presencia de *Staphylococcus aureus* se debe picar una o más colonias típicas y realizar las pruebas de catalasa y coagulasa. Para la prueba de catalasa se debe emplear peróxido de hidrógeno al 30% y para la prueba de coagulasa se debe inocular un tubo de caldo BHI con una colonia típica e incubar por 24 horas a 37 °C. Después de este tiempo se debe añadir al tubo con el medio



0.5 mililitros de plasma humano, esta mezcla se incuba por 4 a 24 horas a 36 °C. Un coágulo bien formado indica un resultado positivo (15,21).

Si no se observan colonias en el agar Lethen modificado o en Vogel Jonson, se deben preparar diluciones de enriquecimiento e incubarlas por 7 días, observándolas diariamente. Después de los 7 días o cuando se sospecha crecimiento se subcultivan los caldos en cajas conteniendo agar Lethen modificado y en cajas conteniendo agar MacConkey. Ambos medios se incuban 48 horas a 30 +/- 2 °C. Si hay crecimiento luego del enriquecimiento, se elaboran frotos de Gram de las colonias y se procede a realizar las pruebas de identificación señaladas más adelante en la metodología. Si no hay crecimiento, el cosmético se encuentra libre de agentes bacterianos (15).

Como un procedimiento regular muchas fábricas de cosméticos usan el método de desafío microbiano. En este ensayo, las muestras de cosméticos son inoculadas con organismos bajo estudio y luego inspeccionadas visualmente y por el uso de un recipiente de conteo donde se determina si la reducción bacteriana ha tenido lugar. Los microorganismos son ofrecidos por la organización American Type Culture Consumer (ATCC), aunque algunos microorganismos resistentes de la planta de manufacturado de cosméticos son también ensayados. Los géneros más notorios incluyen *Pseudomonas* y otros microorganismos Gram-negativo, bacterias Gram-positivo, *Staphylococcus* sp. y varias levaduras y mohos. La duración del ensayo puede involucrar de dos a tres semanas hasta varios meses. El método además sigue la recomendación de la CTFA (Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association) y ASTM (American Society for Testing and Materials) de efectuar dos desafíos varias semanas

aparte. Otro ensayo muy reproducible ha sido el de desafíos múltiples, en el cual todas las formulaciones son desafiadas a extinción; por ejemplo, hasta que los microorganismos son rutinariamente recuperados de las muestras bajo ensayo. Una opinión se emite después del mínimo número de desafíos que no produce recuperación. Tres sucesivos positivos deben ser considerados una indicación de falla con el sistema (14).

#### I. LABORATORIOS PRODUCTORES DE COSMÉTICOS EN GUATEMALA:

Según una encuesta realizada por el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, hasta el año 2001 se encontraban registrados 37 laboratorios guatemaltecos productores de cosméticos, sin embargo esta encuesta no especifica la cantidad de los mismos que producen cosméticos para bebés.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala es escasa la inversión en los sistemas de control de calidad de las industrias locales, debido al alto costo de los insumos de laboratorio, generando así riesgos para el consumidor si el producto no cumple con los requisitos de calidad microbiológica, fisicoquímica y toxicológica.

Los productos cosméticos para bebés deben ser evaluados microbiológicamente, ya que están destinados a un grupo etéreo susceptible a las infecciones y serán puestos en contacto con tejidos que no han sido expuestos a una microbiota tan agresiva como en la edad adulta, además en los primeros meses y años de vida el sistema inmune no se encuentra totalmente desarrollado.

En los supermercados de la ciudad de Guatemala, se encuentran a la venta una gran gama de productos cosméticos elaborados por la industria nacional, sin embargo los sistemas de monitoreo de estos productos por parte del Estado son limitados; quedando solamente a la responsabilidad de los fabricantes el garantizar la calidad del producto, y debido a la falta de control y penalización se hace de suma importancia la evaluación microbiológica de los cosméticos para bebés elaborados localmente, a fin de demostrar el grado de cumplimiento de esta responsabilidad.

## V. OBJETIVOS

### A. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la calidad microbiológica de los productos cosméticos elaborados por la industria guatemalteca que se encuentran a la venta en supermercados de la ciudad capital.

### B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Realizar el análisis microbiológico de champúes, cremas, talcos, lociones y aceites para bebés producidos por la industria guatemalteca.
2. Aplicar las técnicas microbiológicas de recuento heterotrófico en placa, diluciones decimales e investigación de microorganismos patógenos al análisis de productos cosméticos para bebés.

## **VI. HIPÓTESIS**

Al menos uno de los productos cosméticos para bebés elaborados por la industria guatemalteca que se expenden en supermercados de la Ciudad de Guatemala no cumple con los parámetros de calidad microbiológica establecidos por el Laboratorio Nacional de Salud.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS:

Los materiales y métodos utilizados en el estudio fueron los siguientes:

### A. Muestra:

En el estudio se analizaron diecinueve productos cosméticos para bebés que fueron adquiridos en un supermercado de la ciudad capital, pertenecientes a cinco marcas diferentes elaboradas por la industria guatemalteca, lo cual representa el 14% de las marcas registradas en Guatemala. El estudio incluyó cinco champúes, cinco lociones, tres cremas, tres talcos y tres aceites.

### B. Materiales:

#### 1. Equipo:

- a. Incubadora Precision
- b. Refrigerador Fogel
- c. Refrigerador Atlas
- d. Esterilizador eléctrico de presión y vapor
- e. Campana de flujo laminar
- f. Autoclave marca Castle ajustable
- g. Sistema de anaerobiosis Gas pack
- h. Pipeteadores marca Brand.
- i. Vortex marca Genie de 10 velocidades.

## 2. Reactivos:

### a. Medios de cultivo deshidratados:

- i. Agar Vogel Johnson
- ii. Agar Sabouraud Dextrosa
- iii. Agar triptosa sulfito cicloserina base para anaerobios
- iv. Agar Lethen Modificado
- v. Caldo Lethen Modificado
- vi. Agar Bilis Esculina
- vii. Caldo MRVP
- viii. Caldo Nitrato
- ix. Caldo BHI
- x. Caldo Tioglicolato
- xi. Citrato de Simmons
- xii. Agar Cetrimida
- xiii. Agar Tripticasa Soya
- xiv. Agar base para la Oxidación y Fermentación de Carbohidratos
- xv. Agar Triple Azúcar Hierro
- xvi. Agar MacConkey
- xvii. Gelatina Nutritiva
- xviii. Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO)
- xix. Caldo Urea

b. Reactivos para pruebas bioquímicas:

i. Reactivo para reducción de nitratos

ii. Reactivo de Kovacs

iii. Reactivos para prueba de Voges Proskauer

iv. Alcohol acetona para Gram

v. Lugol de Gram

c. Colorantes:

i. Colorante de Cristal violeta

ii. Colorante de rojo de metilo

iii. Colorante de Safranina

iv. Verde de malaquita (Según Bartholomew y Mittmer)

3. Cristalería:

a. Erlenmeyer de vidrio pyrex, de 200, 500 y 1000 mililitros.

b. Varillas de vidrio.

c. Esparcidores de vidrio en forma de L.

d. Cajas de Petrie de vidrio de 65 milímetros de diámetro.

e. Probetas de vidrio graduadas de 100 y 500 mililitros.

f. Pipetas de vidrio de 1, 5 y 10 mililitros.

g. Frascos de vidrio de 100 mililitros con tapón de rosca.

h. Tubos de ensayo de 20 mililitros con tapón de rosca.



4. Cepas control:

- a. *Escherichia coli* ATCC 35218
- b. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- c. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- d. *Candida albicans* cepa del Laboratorio Clínico Popular.
- e. *Clostridium perfringens* cepa del Laboratorio Nacional de Salud.

**C. Metodología utilizada en el estudio:**

Para el análisis de las muestras se llevó a cabo el procedimiento analítico propuesto por FDA, el cual se detalla a continuación:

1. Diluciones: Se midieron 5 mililitros de las muestras líquidas y se pesaron 5 gramos en caso de polvos y cremas. Estos se disolvieron en 45 mililitros de caldo Letheen modificado. Se agitó bien y se añadió 1 mililitro de tween 80 para facilitar la disolución de talcos y cremas. Con ello se logró la dilución 1:10. Luego se tomó 1 mililitro de esta dilución y se añadió a 9 mililitros de caldo Letheen modificado, para hacer la dilución 1:100. En el caso de talcos y productos aceitosos se agregó la mezcla anterior a un tubo de ensayo que contenía 1 mililitro de tween 80 con perlas de vidrio y luego se agitó en vortex.

2. Siembra en medios específicos: Se tomó 0.1 mililitro de la dilución 1:10 y se sembró por esparcido en agar Letheen modificado, agar Vogel Jonson y agar Sabouraud Dextrosa, utilizando para ello un esparcidor de vidrio en forma de L. Se realizaron duplicados de cada siembra. En el caso de talcos, estos se sembraron también en agar triptosa sulfito cicloserina base.

Luego se tomó 0.1 mililitro de la dilución 1:100 y se sembró por esparcido en agar Lethen modificado y agar Vogel Jonson, haciendo también duplicados para cada siembra.

El medio Lethen modificado se incubó a 30 °C por 24 a 48 horas.

El medio Sabouraud Dextrosa se incubó a 30 °C por 7 días.

El medio Vogel Jonson se incubó a 37 °C por 48 horas.

El medio triptosa sulfito cicloserina se incubó a 37 °C por 2 días en ambiente de anaerobiosis.

3. Coloración de Gram: Se realizó un frote de cada una de las colonias encontradas en los medios incubados y se tiñó con la coloración de Gram.

La preparación de medios de cultivo, reactivos para pruebas bioquímicas y colorantes se encuentra detallada en el anexo número 1.

4. El procedimiento analítico propuesto por FDA para la identificación de diversos microorganismos y que se siguió para el análisis de los controles positivos es el siguiente:

a. Identificación de Enterobacterias: Del medio Lethen modificado tomar una colonia y se aislarla en agar MacConkey. Se debe incubar 24 horas a 37 °C observándose crecimiento y fermentación de lactosa. Luego inocular los medios de TSI, LIA, MIO, Citrato y urea. Inocular también en dos tubos de caldo MRVP. Luego incubar todos los medios 24 horas a 37 °C, excepto el caldo MRVP que se deberá incubar 48 horas o más. Leer los resultados para compararlos con una tabla de reacciones para lograr la identificación completa. A un tubo de caldo MRVP añadir 4 gotas de colorante de rojo de metilo, si la prueba es positiva el cultivo se teñirá de rojo. Al segundo tubo de MRVP

añadir 4 gotas de reactivo A y 6 gotas de reactivo B. Si la prueba es positiva el cultivo se teñirá de una coloración rojiza (22, 23, 24).

b. Identificación de bacilos Gram negativo no fermentadores: Sembrar en agar cetrimida las colonias del agar Lethen modificado. Inocular también en agar Bilis esculina, MIO, Caldo nitrato, medio OF con glucosa, sucrosa, lactosa, fructosa, manitol y maltosa. Se observan los resultados y se comparan con tablas de identificación para bacilos Gram negativo no fermentadores (15, 24).

c. Identificación de Cocos Gram positivo: Observar crecimiento en agar Vogel Jonson. De las colonias aisladas en dicho medio debe realizarse una tinción de Gram. Realizar la prueba de catalasa a una colonia sospechosa de *S. aureus* colocando una gota de peróxido de hidrógeno al 30% en un portaobjetos y luego añadir una asada de la colonia. La prueba será positiva cuando se liberen burbujas de oxígeno. También se realiza la prueba de coagulasa inoculando una porción de la colonia sospechosa en 0.5 mililitros de caldo BHI. Incubar por 4 a 24 horas y después de este tiempo añadir 0.5 mililitros de plasma humano o plasma liofilizado de conejo. Se incuba 6 horas a 37 °C y pasado este tiempo se examina la formación de un coágulo. Las colonias catalasa positivo y coagulasa positivo se identificarán como *S. aureus* (15,22). Si la prueba de catalasa fuere negativa, se inocula el slant de un agar bilis esculina y un tubo con Caldo tripticasa soya con 6.5% de NaCl. Incubar los dos medios a 37 °C por 24 horas. Si el microorganismo produce una coloración negra en agar bilis esculina y crece en presencia de NaCl se identifica como "*Enterococcus* spp". Si el microorganismo produce una

coloración negra en bilis esculina pero no crece en presencia de NaCl se debe reportar como "*Streptococcus* Grupo D no enterococos" (15, 22)

d. Identificación de Bacilos Gram positivo: Si el frote de Gram revela crecimiento de bacilos Gram positivo, se debe realizar una coloración de esporas con verde de malaquita. Luego se inocula una colonia en agar MIO y después de 24 horas de incubación a 37 °C se determina si hay crecimiento por turbidez alrededor de la línea de inoculación. También se puede hacer una preparación en fresco suspendiendo una porción de la colonia en una gota de solución salina en un portaobjetos y se coloca encima un cubreobjetos. Observar esta preparación en objetivo seco fuerte (40 X). La caracterización adicional de los bacilos Gram positivo es generalmente innecesaria (15).

e. Identificación de *Pseudomonas aeruginosa*: Para su identificación se realiza la prueba de oxidasa colocando una tira de papel filtro sobre un portaobjetos, luego añadir una gota del reactivo de oxidasa y sobre él una porción de la colonia sospechosa tomada con un palillo de madera estéril del agar Lethen modificado o Cetrimida. Luego se inocula en agar TSI, caldo nitrato, gelatina nutritiva y agar citrato de Simmons. *Pseudomonas aeruginosa* muestra crecimiento en TSI, pero la superficie y el fondo no cambian de coloración; reduce nitratos a nitritos, produce licuefacción de la gelatina y crece en agar citrato (15).

f. Identificación de Bacterias anaerobias: Debido a que no se permite la presencia de bacterias anaerobias en talcos, se debe observar si hay crecimiento en los medios incubados en anaerobiosis a las 48 horas de incubación. Si hay crecimiento se realiza el recuento de colonias y se reporta

como número de colonias por gramo, siendo innecesaria la identificación de las mismas (15, 16).

#### **D. Elaboración de controles positivos:**

Para la elaboración de los controles positivos se utilizaron cepas de bacterias conocidas cuyas reacciones frente a diversos sustratos han sido tipificadas previamente. Se inició con la preparación de una suspensión de bacterias en solución salina estéril, dicha suspensión se igualó al estándar 0.5 de MacFarland. Luego se agregó una asada de cada suspensión a un tubo conteniendo 9 mililitros de caldo Lethen modificado. Para ello se utilizó un asa calibrada de 0.005 mililitros. A cada uno de estos tubos se agregó 1 mililitro o 1 gramo de diferentes cosméticos, de tal manera que se obtuvieron cinco diluciones 1:10 de controles positivos. Dichos controles estuvieron conformados por un talco contaminado con *Clostridium perfringens*, una loción con *Escherichia coli*, una crema con *Staphylococcus aureus*, un champú con *Candida albicans* y un aceite con *Pseudomonas aeruginosa*.

#### **E. Diseño de la investigación:**

1. Diseño del muestreo: Se llevó a cabo un muestreo no probabilístico por conveniencia, seleccionando todas las muestras de un supermercado de la Ciudad de Guatemala escogido también por conveniencia. No se realizaron réplicas por marca ni por producto.

## 2. Análisis de resultados:

a) Evaluación de la calidad microbiológica de los cosméticos analizados, con base en el cumplimiento de los parámetros establecidos por el Laboratorio Nacional de Salud.

b) Análisis descriptivo de los resultados obtenidos, presentando tablas.

## VIII. RESULTADOS

La adquisición de muestras para esta investigación se llevó a cabo en un supermercado de la zona 12 tomado por conveniencia. En dicho supermercado se compraron diecinueve productos cosméticos para bebés elaborados por industrias guatemaltecas. La cantidad de la muestra estuvo determinada por la disponibilidad de los productos al momento de realizarse el muestreo; dentro del mismo se incluyeron cinco marcas diferentes, quedando la muestra conformada por cuatro lociones, cuatro champúes, tres aceites, cuatro talcos y cuatro cremas. El sistema de identificación utilizado para las muestras analizadas se encuentra registrado en la tabla 1.

**TABLA 1**  
**IDENTIFICACIÓN DE LOS TIPOS DE MUESTRAS**  
**ANALIZADAS POR MARCA.**

Marca	MUESTRAS				
	1	2	3	4	5
A	X	X	X	X	X
B	X	X	X	X	X
C	X	X		X	X
D	X	X	X		X
E				X	

Tipos de muestras:

1: Loción      2: Champú      3: Aceite      4: Crema      5: Talco

Para la validación del estudio se prepararon controles positivos, los cuales estaban formados por muestras de cosméticos contaminados con cepas conocidas. Para la inoculación de las bacterias en los cosméticos usados como control se tomó una asada de cada cultivo, se agregó a un tubo conteniendo solución salina al 0.85% previamente esterilizada. Luego se comparó y se igualó con un estándar de Mac Farland 0.5 y se agitó bien antes de inocular una asada con asa calibrada de 0.005 mililitros a los cosméticos. El procedimiento de inoculación de los controles positivos se llevó a cabo cerca de un mechero y siguiendo todas las precauciones y normas de bioseguridad recomendadas por el laboratorio para trabajar con muestras peligrosas.

Todos los controles positivos fueron sembrados en medios de enriquecimiento y en medios selectivos. Los resultados de las pruebas de los controles positivos se encuentran registrados en la tabla 2.

**Tabla 2**  
**Resultados de las pruebas realizadas a los controles positivos**

Tipo de muestra	Microorganismo	Pruebas realizadas	Resultados <sup>a</sup>	Conclusión
Loción	<i>Escherichia coli</i>	Agar McConkey	Colonias lactosa positivo	S
		TSI	A/A +	
		LIA	K/A +	
		MIO	- + -	
		CITRATO	-	
		UREA	-	
		MRVP	+ -	
Crema	<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar Vogel Jonson	Colonias sulfito reductoras con halo claro alrededor	S
		Catalasa	+	
		Coagulasa	+	
		Manitol sal	+	
Aceite	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Agar cetrimida	Colonias verdes	S
		Caldo nitrato	Reduce nitratos a nitritos	
		Oxidasa	Positivo	
		TSI	No cambia	
		Gelatina nutritiva	Licuefacción de la gelatina	
Talco	<i>Clostridium prfringens</i>	Agar Triptosa sulfito cicloserina	Colonias blancas mucosas de bordes irregulares	S
Champú	<i>Candida albicans</i>	Agar Sabouraud dextrosa	Colonias blancas mucosas	S
		Formación de tubos germinales	Positivo	
		Observación en fresco	Levaduras ovaladas	

S = Satisfactorio, coincide con el microorganismo inoculado.

a: Tomado de Koneman *et.al.* (24).

La preparación de los medios de cultivo para controles y muestras incluyó pruebas de esterilidad y funcionamiento, ya que se esperaba que todos los medios estuvieran preparados adecuadamente en caso de que se encontraran muestras contaminadas. Los resultados de las pruebas de esterilidad y funcionamiento se encuentran registrados en el anexo 2.



Para la evaluación microbiológica de las diecinueve muestras analizadas se llevaron a cabo diversos procedimientos, siendo el primero de ellos la dilución de las muestras utilizando caldo Letheen modificado. El análisis de todas las muestras inició con la dilución 1:10 y de ésta se tomó 1 mililitro para elaborar la dilución 1:100. Ambas diluciones se sembraron en agar Letheen modificado para el recuento aeróbico total.

Para las muestras de aceites, cremas y talcos se añadió 1 mililitro de polisorbato 80 al caldo de dilución, con el fin de inhibir los preservantes presentes en la muestra y permitir que los microorganismos crecieran en los medios de cultivo. Este compuesto también permitió la disolución de las muestras en el caldo.

Como puede observarse en la tabla número 3, solamente la muestra A5 presentó crecimiento bacteriano, en tanto que las dieciocho muestras restantes no presentaron crecimiento alguno, por lo cual los resultados fueron expresados como menores al factor de dilución empleado, las normas para el recuento y el reporte de resultados se encuentran en el anexo 3.

La muestra de talco con identificación A5 presentó un crecimiento bacteriano estimado de 50 Unidades formadoras de colonia por gramo en la dilución 1:10 y un crecimiento estimado de 10 Unidades formadoras de colonia por gramo en la dilución 1:100; siendo ésta la única muestra de la cual se obtuvo crecimiento en las cajas de agar Letheen modificado

**Tabla 3**  
**Resultados de crecimiento en Agar Lethen Modificado<sup>1</sup> expresados en Unidades Formadoras de Colonias (UFC).**

MARCA	IDENTIFICACIÓN	RECUENTO AERÓBICO 1:10	RECUENTO AERÓBICO 1:100
A	A1	<10 UFC/ml <sup>a</sup>	<10 UFC/ml
	A2	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
	A3	<10 UFC /ml	<10 UFC/ml
	A4	<10 UFC/g	<10 UFC/g
	A5	<b>50 UFC/g *</b>	<b>&lt;100 UFC/g *</b>
B	B1	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
	B2	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
	B3	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
	B4	<10 UFC/g	<10 UFC/g
	B5	<10 UFC/g	<10 UFC/g
C	C1	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
	C2	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
	C4	<10 UFC/g	<10 UFC/g
	C5	<10 UFC/g	<10 UFC/g
D	D1	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
	D2	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
	D3	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
	D5	<10 UFC/g	<10 UFC/g
E	E4	<10 UFC/g	<10 UFC/g

<sup>1</sup> Incubado por 48 horas a 30°C. Método de esparcido.

<sup>a</sup> Debido a que no hubo crecimiento, los resultados se encuentran expresados como menores de la dilución menor sembrada, según anexo 3. Este criterio se aplica a todas las tablas de resultados.

\* Recuento aeróbico estimado debido a que el crecimiento se encontró fuera de los rangos de conteo según anexo 3, en las cajas hubo menos de 30 colonias.

Se realizó un frote de las colonias encontradas para hacer una coloración de Gram de las mismas, observándose Bacilos Gram positivo cortos y gruesos, agrupados en cadenas. Luego se realizó un frote de las mismas colonias, el cual se tiñó con verde de malaquita según la técnica de Bartholomew y Mittmer, en este frote se encontraron bacilos esporoformadores, con esporas terminales. Se realizaron las pruebas de movilidad para dichos bacilos, las cuales incluyeron siembra en agar MIO y observación de las bacterias en fresco utilizando solución salina. Las pruebas de movilidad indicaron que los bacilos eran inmóviles.

Siguiendo el esquema de análisis propuesto por el Manual de Análisis Bacteriológico de la FDA de Estados Unidos, la identificación posterior de los bacilos Gram positivo era innecesaria, sin embargo se realizaron catorce

pruebas más, las cuales son recomendadas por Koneman *et. al* (24), a pesar de ello, la bacteria encontrada no pudo ser identificada. Los resultados de estas pruebas se encuentran registrados en el anexo 4.

La tabla 4 representa los resultados encontrados para las muestras sembradas en agar Vogel Jonson específico para *Staphylococcus aureus*. Para las diecinueve muestras se sembró dilución 1:10 y dilución 1:100, siguiendo la técnica de esparcido. Como puede observarse en dicha tabla, ningún cosmético mostró crecimiento bacteriano.

**Tabla 4**  
**Resultados de la siembra para investigación de *S. aureus* en agar Vogel Jonson\***

IDENTIFICACIÓN	RECuento DE <i>S. aureus</i> Dilución 1:10	RECuento DE <i>S. aureus</i> Dilución 1:100
A1	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
A2	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
A3	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
A4	<10 UFC/g	<10 UFC/g
A5	<10 UFC/g	<10 UFC/g
B1	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
B2	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
B3	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
B4	<10 UFC/g	<10 UFC/g
B5	<10 UFC/g	<10 UFC/g
C1	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
C2	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
C4	<10 UFC/g	<10 UFC/g
C5	<10 UFC/g	<10 UFC/g
D1	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
D2	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
D3	<10UFC/ml	<10UFC/ml
D5	<10 UFC/g	<10UFC/g
E4	<10 UFC/g	<10 UFC/g

\*Incubado a 30°C por 48 horas. Método de esparcido.

En la tabla 5 también se observan los resultados obtenidos de la siembra en agar Sabouraud dextrosa de las diecinueve muestras. Para este caso en particular únicamente se sembró la dilución 1:10 y siguiendo la marcha analítica propuesta por FDA, las cajas con dicho agar se incubaron por siete días a 30 °C. En ninguna de las muestras se observó crecimiento de mohos o levaduras, por lo cual todos los resultados se encuentran expresados como menor de la dilución sembrada.

**Tabla 5**  
**Resultados de la siembra para la investigación de Hongos y Levaduras en agar Sabouraud Dextrosa \***

IDENTIFICACIÓN	RECuento DE HONGOS Y LEVADURAS Dilución 1:10
A1	<10 UFC/ml
A2	<10 UFC/ml
A3	<10 UFC/ml
A4	<10 UFC/g
A5	<10 UFC/g
B1	<10 UFC/ml
B2	<10 UFC/ml
B3	<10 UFC/ml
B4	<10 UFC/g
B5	<10 UFC/g
C1	<10 UFC/ml
C2	<10 UFC/ml
C4	<10 UFC/g
C5	<10 UFC/g
D1	<10 UFC/ml
D2	<10 UFC/ml
D3	<10 UFC/ml
D5	<10 UFC/g
E4	<10 UFC/g

\* Incubado por 7 días a 30°C. Método de esparcido.

En la tabla 6 se encuentran registrados los resultados obtenidos de la siembra de las muestras de talcos en agar Sulfito Triptosa Cicloserina, el cual permite el crecimiento de bacterias anaerobias al ser incubado en una atmósfera libre de oxígeno. Para este análisis se utilizaron únicamente las diluciones 1:10 de cada muestra de talco, y tal como se observa en la tabla, ninguna de las cuatro muestras presentó crecimiento bacteriano, por lo que los resultados también se expresaron como menores a la dilución sembrada.

**Tabla 6**  
**Resultados de la siembra de muestras de talcos en agar Triptosa Sulfito Cicloserina para anaerobios\***

IDENTIFICACIÓN	RECUENTO DE BACTERIAS ANAEROBIAS Dilución 1:10
A5	<10 UFC/g
B5	<10 UFC/g
C5	<10 UFC/g
D5	<10 UFC/g

\*Incubado por 48 horas en condiciones de anaerobiosis a 37°C. Método de esparcido.

Los resultados globales indican que solamente la muestra A5 presentó crecimiento bacteriano, pero se encuentra libre de patógenos, por lo cual sí cumple con las especificaciones del Laboratorio Nacional de Salud para productos utilizados fuera del área de los ojos, al poseer un recuento aeróbico menor a 1000 Unidades formadoras de colonia por gramo.

Ninguno de los dieciocho productos cosméticos restantes contiene contaminación bacteriana, por lo que se logró determinar que todos los productos cosméticos muestreados cumplen con los parámetros de calidad microbiológica establecidos por el Laboratorio Nacional de Salud, y se encuentran aptos para su venta y posterior consumo.

## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La evaluación microbiológica de los productos de consumo humano permite conocer de manera indirecta la efectividad de los sistemas de calidad empleados en las industrias que elaboran dichos productos, pudiéndose determinar también si las condiciones de la materia prima, el personal, el equipo y los procedimientos de manufactura cumplen con los requisitos de calidad y son aptos para la fabricación de productos inocuos al consumidor. Con esta investigación se logró evaluar diferentes marcas de productos cosméticos para bebés, con el fin de brindar información al consumidor sobre la calidad e inocuidad del producto en expendio.

El muestreo se realizó en un supermercado de la ciudad capital, escogido por conveniencia, teniendo en cuenta que la muestra incluyera todas las marcas nacionales de productos cosméticos para bebés puestos a la venta en dicho supermercado. De las marcas A y B se encontró la línea completa, mientras que la marca C no tenía a la venta aceite y a la marca D le hizo falta crema para completar la línea. De la marca E únicamente se encontró un producto, correspondiente a una crema. La muestra quedó conformada por diecinueve productos ya que solamente éstos se encontraban disponibles al momento de seleccionar la muestra.

Con este tipo de muestreo se evidencia la disponibilidad de los productos de cada marca en un momento y la muestra fue representativa ya que se pudo completar el análisis incluyendo todos los productos que según su consistencia, recomienda evaluar FDA.

Los resultados de esta investigación se encuentran validados por la elaboración de controles positivos, los cuales fueron analizados antes de analizar las muestras del estudio, con el fin de garantizar que los procedimientos fueran realizados correctamente. Cada control positivo fue analizado siguiendo el procedimiento dependiendo del tipo de microorganismo.

El procedimiento empleado requiere la elaboración de diluciones de las muestras, con el fin de permitir el recuento de colonias en caso de que exista

crecimiento de bacterias u hongos. Para la determinación de bacterias anaerobias en talcos se trabaja únicamente con la dilución 1:10, puesto que para este tipo de muestras la población bacteriana no suele ser numerosa.

El procedimiento de hongos y levaduras también se realiza solamente con la dilución 1:10, ya que ello facilita el recuento de estructuras fúngicas.

Con base en los resultados obtenidos, es denegada la hipótesis planteada al inicio de la investigación y se admite que los productos cosméticos para bebés elaborados por la industria guatemalteca que fueron incluidos en el estudio cumplen con las normas de calidad y reúnen los requisitos microbiológicos para ser consumidos por la población y no representan riesgo alguno de provocar infecciones bacterianas al ser utilizados.

Por contener un bacilo Gram positivo, la muestra que presentó crecimiento fue sometida a un análisis posterior, que consistió de una serie de pruebas bioquímicas y de crecimiento, con el fin de determinar si la muestra contenía *Bacillus anthracis* o *Bacillus cereus*, los cuales podrían ocasionar daños al consumidor. *B. anthracis* ocasiona daños tópicos al entrar en contacto con heridas expuestas o piel lesionada, como en el caso de las lesiones causadas por la patología denominada "pañalitis", la cual es muy común entre los bebés y niños que utilizan pañal desechable. *B. cereus*, al encontrarse en grandes cantidades puede causar intoxicación si es inhalado o ingerido, en especial por bebés o niños pequeños cuyo sistema inmunológico no ha completado su desarrollo (24). Sin embargo, las pruebas realizadas al bacilo Gram positivo que contenía la muestra no coincidieron con ninguno de los bacilos mencionados anteriormente, además el conteo del crecimiento en las cajas de Agar Lethen Modificado cumple con los requisitos microbiológicos señalados por el Laboratorio Nacional de Salud. Los resultados de las pruebas realizadas al bacilo encontrado se registraron en el anexo 4.

Con este estudio se abarcó el espectro de pruebas necesarias para permitir el crecimiento bacteriano en caso de que las muestras se encontraran contaminadas con diversos microorganismos. La FDA recomienda la

investigación de bacterias patógenas, en especial *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Clostridium perfringens* y en el caso de los hongos y levaduras se recomienda el análisis para la investigación de *Candida albicans* en las muestras. Por esta razón. Los resultados obtenidos en este estudio se encuentran validados por la elaboración de controles positivos, demostrándose también que el procedimiento analítico empleado proporciona datos confiables, habiéndose elaborado los controles positivos con bacterias de estos géneros y *Candida albicans* para evaluar hongos.

Por medio del análisis microbiológico de las muestras incluidas en este estudio se pudo concluir que los productos terminados y puestos a la venta que se analizaron cumplen con los parámetros de calidad microbiológica especificados por el Laboratorio Nacional de Salud y son aptos para su uso.



## X. CONCLUSIONES

1. 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.
2. Los resultados obtenidos en este estudio se encuentran validados por la elaboración de controles positivos, los cuales permitieron determinar si los procedimientos analíticos, los medios de cultivo y las pruebas bioquímicas permitían la recuperación de microorganismos presentes en las muestras y si su identificación era correcta.
3. 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 *B. anthracis* o *B. cereus*, los cuales pueden ocasionar daños a la piel del consumidor, sobre todo tratándose de bebés cuya piel es mucho más sensible a los agentes bacterianos patógenos; sin embargo los resultados de las pruebas realizadas no son compatibles con ninguna de las dos especies mencionadas.
4. Debido a la importante función que cumplen los preservantes en los productos cosméticos analizados se puede determinar que dichos compuestos se encuentran en la concentración necesaria para lograr la inhibición del crecimiento bacteriano en el producto terminado y puesto a la venta, ya que en ninguna de las muestras se observó crecimiento bacteriano.
5. Durante el procedimiento analítico llevado a cabo en este estudio solamente se pudo evaluar la calidad microbiológica de las muestras, ignorándose si las mismas cumplen con los requisitos de calidad fisicoquímica y toxicológica exigidos por el Laboratorio Nacional de Salud y con las normas internacionales referentes a estos dos aspectos.

## XI. RECOMENDACIONES

1. La elaboración de controles positivos es recomendable al momento de realizar análisis microbiológicos, debido a que puede saberse de inmediato si hay problemas con los medios de cultivo o reactivos, además permite determinar si los procedimientos analíticos logran los resultados esperados para las muestras conocidas, otorgando con ello mayor confiabilidad a los resultados de las muestras escogidas para la investigación.
2. Para la elaboración de los controles positivos es recomendable el uso de cepas conocidas y tipificadas, de preferencia con número de ATCC, ya que con ello se evita la mala interpretación de pruebas microbiológicas, evitándose al mismo tiempo la identificación incorrecta de bacterias que puedan encontrarse en las muestras analizadas.
3. Se recomienda realizar un estudio de cosméticos mucho más amplio, el cual incluya la evaluación microbiológica, fisicoquímica y toxicológica de las muestras, a fin de determinar si estas cumplen con los requisitos internacionales y con los parámetros del laboratorio Nacional de Salud, ya que mediante la realización de este estudio únicamente se analizaron las características microbiológicas, dejando un tema abierto para la investigación.
4. Se recomienda la elaboración de un estudio sobre las características microbiológicas, fisicoquímicas y toxicológicas de los productos cosméticos importados y puestos a la venta en Guatemala, con la finalidad de comprobar la calidad de los mismos para ofrecer esta importante información a los consumidores de dichos productos.

## XII. REFERENCIAS:

1. US Food & Drug Administration. Center For food Safety & Applied Nutrition. Domestic Cosmetics program. Chapter 29. Julio 2000.  
[www.fda.gov](http://www.fda.gov)
2. Boletín 2001. Marzo 2001. México. [www.cirugiaplastica.org.mx](http://www.cirugiaplastica.org.mx)
3. Martini M.C. 1998. Dermatología y Cosmetología. Volumen 3.
4. Wilkinson J.B. y Moore R.J. 1990. Cosmetología de Harry. España. Ediciones Díaz Santos.
5. [www.reforma.com/salud/articulo/222950.html](http://www.reforma.com/salud/articulo/222950.html)
6. Velásquez G.C. 1990. Informe final de ejercicio profesional supervisado. Escuela de Química Biológica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. Pp.23-25.
7. Balsam M.S. *et.al.* 1972. Cosmetics Science and Technology. Trad. Gabriel Barnett. Estados Unidos. Board Wiley Interscience. Vol. 1.
8. Standards and Recommendations for Hospital care of Newborns Infants. 1971. 5ta. Edición. Estados Unidos de Norteamérica. Committee on Fetus and Newborns. Pp. 109.
9. De Hoyo A. 2002. Alergias e infecciones por el maquillaje. Puerto Rico.  
[www.consalud.com](http://www.consalud.com)
10. Friedman M.A. 1996. FDA`s Letter. [www.fda.gov](http://www.fda.gov)
11. Consumer Industrial Especialties. Personal Care. Septiembre 2002.  
[www.saludenlinea.com](http://www.saludenlinea.com)

12. [www.uninet.edu/tratado/c101001.html](http://www.uninet.edu/tratado/c101001.html)
13. Mufti J. *et. al.* 2001. Protección bacteriológica de productos del cuidado personal y para la casa. [www.Dermared.com](http://www.Dermared.com)
14. Morales A.R. 2002. Cosméticos Peligrosos. Revista La Guía del golfo. (USA). 2(25) [www.guiadelgolfo.com](http://www.guiadelgolfo.com)
15. US Food & Drug Administration. 1991. Center for Food Safety & Applied Nutrition. Microbiological Methods for Cosmetics. Chapter 23. [www.USFDA.com](http://www.USFDA.com)
16. Arriola L. 2002. Metodologías de análisis de cosméticos. Laboratorio Nacional de Salud. Comunicación personal.
17. MERCOSUR. 1998. Parámetros de Control Microbiológico para productos de Higiene Personal, Cosméticos y Perfumes. (Arg.) 6 (51): 32-35.
18. Altunaga L. *et. al.* 2001. Calidad sanitaria de cosméticos de producción nacional y de importación durante 1999. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición. (Cuba). 15 (1): 74-77.
19. Norma guatemalteca obligatoria COGUANOR 30 023. 1992. Diario de Centroamérica. Guatemala, mayo.
20. Manual de medios de cultivo MERCK. 1994. Pp. 121, 188, 253, 260.
21. Torres M. F. 1999. Manual Práctico de Bacteriología Médica. 2da. Edición. Guatemala. Serviprensa. Pp. 142.
22. Gini G. 1995. Manual de procedimientos para identificación de las bacterias con importancia clínica. 2da. Edición. Pp. 115-118.

23. Delaat A. N. 1983. Microbiología. 2da. Edición. México. Nueva Editorial Interamericana. Pp. 357-403.
24. Koneman W. E., Stephen D. A., *et. al.* 1999. Diagnóstico Microbiológico. 5ta. Edición. Argentina. Editorial Médica Panamericana. Pp. 631-686.

### XIII. ANEXOS

#### *ANEXO 1.*

#### *Preparación de medios de cultivo, reactivos para pruebas bioquímicas y colorantes:*

##### **A. Medios de cultivo deshidratados:**

1. Agar Vogel Johnson: Suspender 61 gramos del medio deshidratado en 1 litro de agua desmineralizada, calentar para disolver y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C. Cuando se enfríe aproximadamente a 44°C agregar 5.7 mililitros de telurito de potasio estéril. Servir en cajas.
2. Agar Sabouraud Dextrosa: Suspender 65 gramos del medio deshidratado en 1 litro de agua desmineralizada, calentar para disolver y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C, cuando se enfríe a aproximadamente a 44°C agregar 10 mililitros de ácido tartárico estéril. Servir en cajas.
3. Agar triptosa sulfito cicloserina base para anaerobios: Suspender 42 gramos del medio deshidratado en 1 litro de agua desmineralizada, calentar para disolver y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C. Servir en cajas.
4. Agar Lethen Modificado: Suspender 40 gramos de agar tripticasa soya, 5 gramos de lecitina y 10 mililitros de tween 80 (polisorbato 80) en 1 litro de agua desmineralizada, calentar bien hasta lograr la disolución completa de todos los componentes. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C. Servir en cajas.

5. Caldo Letheen Modificado: Suspender 30 gramos de caldo tripticasa soya, 5 gramos de lecitina y 10 mililitros de tween 80 en 1 litro de agua desmineralizada, calentar bien hasta lograr la disolución completa de todos los componentes. Servir en tubos o frascos con tapón de rosca y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
6. Agar Bilis Esculina: Suspender 64 gramos del medio deshidratado en 1 litro de agua desmineralizada, calentar hasta disolver, servir en tubos y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
7. Caldo MRVP: Suspender 17 gramos del medio deshidratado en 1 litro de agua desmineralizada, calentar hasta disolver, servir en tubos y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
8. Caldo Nitrato: Suspender 17 gramos del medio deshidratado en 1 litro de agua desmineralizada, calentar hasta disolver, servir en tubos y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
9. Caldo BHI: Suspender 37 gramos del medio deshidratado en 1 litro de agua desmineralizada, calentar hasta disolver, servir en tubos y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
10. Caldo Tioglicolato: Suspender 29.8 gramos del medio deshidratado en 1 litro de agua desmineralizada, calentar hasta disolver, servir en tubos y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. Utilizar inmediatamente o refrigerar hasta su utilización. Antes de ser inoculado calentar los tubos hasta que el medio cambie a una coloración amarilla.

11. Citrato de Simmons: Suspender 24.2 gramos del medio deshidratado en 1 litro de agua desmineralizada, calentar hasta disolver, servir en tubos y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
12. Agar Cetrimida: Suspender 44.5 gramos del medio deshidratado en 1 litro de agua desmineralizada, calentar hasta disolver, agregar 10 mililitros de glicerol y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. Servir en cajas.
13. Agar Trypticase Soya: Suspender 40 gramos del medio deshidratado en 1 litro de agua desmineralizada, calentar hasta disolver y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
14. Agar base para la Oxidación y Fermentación de Carbohidratos: Suspender 9.4 gramos del medio deshidratado en 1 litro de agua desmineralizada, calentar hasta disolver, servir en tubos y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. Agregar 10 mililitros del carbohidrato estéril deseado a 100 mililitros del medio esterilizado.
15. Agar Triple Azúcar Hierro: Suspender 65 gramos del medio deshidratado a 1 litro de agua desmineralizada, calentar hasta disolver, servir en tubos y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.
16. Agar MacConkey: Suspender 50 gramos del medio deshidratado a 1 litro de agua desmineralizada, calentar hasta disolver y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. Servir en cajas.



17. Gelatina Nutritiva: Suspender 128 gramos del medio deshidratado a 1 litro de agua desmineralizada, calentar hasta disolver, servir en tubos y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.

18. Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO): Suspender 45 gramos del medio deshidratado en 1 litro de agua desmineralizada, calentar hasta disolver, servir en tubos y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C.

19. Caldo Urea: Suspender 38.5 gramos del medio deshidratado en 1 litro de agua desmineralizada, calentar hasta disolver, servir en tubos y esterilizar por 8 minutos a 115 libras de presión (19).

## **B. Reactivos para pruebas bioquímicas:**

1. Reactivo para reducción de nitratos: Deben prepararse dos soluciones:

Solución A: Mezclar 8 gramos de ácido sulfanílico con 1 litro de ácido acético 5 Normal.

Solución B: Mezclar 6 gramos de Naftilamina con 1 litro de ácido acético 5 Normal.

Ácido acético 5 Normal: Mezclar una parte de ácido acético glacial para 2.5 partes de agua destilada.

2. Reactivo de Kovacs: Disolver 10 gramos de p-dimetilaminobenzaldehído en 150 mililitros de alcohol amílico o isoamílico y luego, lentamente agregar 50 mililitros de Ácido clorhídrico concentrado. Agregar agua hasta completar 500 mililitros.

3. Reactivos para prueba de Voges Proskauer:

Solución A: Mezclar 5 gramos de alfa naftol con 100 mililitros de etanol absoluto.

Solución B: Mezclar 40 gramos de KOH en polvo con 100 mililitros de agua destilada.

4. Alcohol acetona para Gram: Mezclar 300 mililitros de acetona con 300 mililitros de etanol al 95%.

5. Lugol de Gram: Mezclar 1 gramo de yodo cristalizado y 2 gramos de yoduro de potasio en 300 mililitros de agua destilada (21,22).

**C. Colorantes:**

1. Colorante de Cristal violeta:

Solución A: Mezclar 2 gramos de colorante cristal violeta al 90% con 20 mililitros de etanol al 95%.

Solución B: Mezclar 0.8 gramos de oxalato de amonio con 80 mililitros de agua desmineralizada.

Mezclar la solución A y la solución B y filtrar en papel filtro después de 24 horas.

2. Colorante de rojo de metilo: Mezclar 0.1 gramo de rojo de metilo con 300 mililitros de etanol al 95%.

3. Colorante de Safranina:

Solución Stock: Mezclar 0.5 gramos de safranina con 100 mililitros de etanol al 95%.

Solución de trabajo: Mezclar 10 mililitros de solución stock con 90 mililitros de agua destilada.

4. Verde de malaquita (Según Bartholomew y Mittmer): Mezclar 7.6 gramos de verde de malaquita con 100 mililitros de agua destilada. Dejar en reposo por 24 horas y filtrar antes de utilizar (21, 22).

**ANEXO 2.**  
**Resultados de pruebas de funcionamiento**  
**de medios de cultivo**

MICROORGANISMO INOCULADO	MEDIO DE CULTIVO	RESULTADO
<i>Staphylococcus aureus</i>	Vogel Jonson	Colonias negras mucosas con halo claro alrededor
	Caldo BHI	Turbidez
	Agar Tripticasa soya	Colonias pequeñas blancas mucosas
	Agar Lethen Modificado	Colonias grandes blancas de bordes irregulares
<i>Escherichia coli</i>	Caldo Lethen Modificado	Turbidez
	Agar McConkey	Colonias lactosa positivo
	TSI	A/A + -
	LIA	K/K + -
	MIO	- + -
	Citrato	-
	Urea	-
	MRVP	+ -
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Agar Cetrimida	Colonias verdes grandes
	OF lactosa	No fermentador
	Gelatina Nutritiva	Licuefacción de la gelatina
	Caldo Nitrato	Reducción de nitratos a nitritos
<i>Clostridium perfringens</i>	Agar Triptosa sulfito cicloserina	Colonias grandes blancas
	Caldo Tioglicolato	Turbidez y coloración amarilla
<i>Candida albicans</i>	Agar Sabouraud Dextrosa	Colonias grandes blancas mucosas

### **ANEXO 3**

#### ***Normas utilizadas en el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos –LAFYM- para la Interpretación de resultados (Conteo de colonias)***

Estas normas fueron tomadas del “Official methods of analysis” y el “Standard methods for the examination of dairy products”.

Todos los conteos en placa computados de duplicados de cajas que contengan menos de 30 y más de 300 colonias son reportados como conteos estimados.

Deben utilizarse los siguientes criterios:

1. Cajas con crecimiento menor a 30 colonias:

Cuando los duplicados de las cajas de la más baja dilución tienen crecimientos menores a 30 colonias, contar el número de cada uno de los duplicados, promediar el número de colonias por caja y multiplicar por el factor de dilución para obtener el conteo en placa estimado. Marcar el conteo con un asterisco para denotar que el recuento es estimado y fuera del rango de 30 a 300 colonias/caja.

2. Cajas con más de 300 colonias:

Cuando el número de colonias por caja excede las 300, contar las colonias en aquellas porciones de la caja que son representativas de la distribución de las colonias. Marcar el resultado con un asterisco para denotar que el recuento es estimado y se encuentra fuera del rango.

3. Colonias extendidas:

Las colonias extendidas son usualmente de tres tipos. El primer tipo es una cadena de colonias no separadas que parecen formadas por la desintegración de un grumo de bacterias. El segundo tipo es uno que se desarrolla en la película de agua entre el agar y el fondo de la caja. El tercer tipo es uno que se desarrolla en la película de de agua en el borde o superficie del agar. Para el reporte, combinar el recuento de crecimientos extendidos y recuento de colonias aisladas si las hubiere para computar el recuento aeróbico en placa.

#### 4. Cajas sin colonias:

Cuando las cajas de todas las diluciones no tienen colonias, reportar el recuento aeróbico en placa como menor que la dilución más baja empleada. Marcar con un asterisco para denotar que el recuento es estimado porque se encuentra fuera del rango.

#### 5. Duplicados de las cajas, una con recuento entre 30 y 300 y la otra con más de 300 colonias:

Contar ambas cajas, incluyendo la que posee más de 300 colonias.

#### 6. Cuando una caja de cada dilución contiene entre 30 y 300 colonias y la otra más de 300 colonias o menos de 30:

Contar todas las cajas e incluir las que tienen más de 300 o menos de 30 en el cómputo.

Para las cajas que se encuentran dentro del rango, se debe seguir el siguiente procedimiento.

- a. Seleccionar las cajas que tengan entre 30 y 300 colonias aisladas.
- b. Computar los conteos bacterianos por mililitro o gramo sembrado multiplicando el promedio de las colonias por el recíproco de la dilución empleada.

Cuando los recuentos sobrepasan las 300 colonias, utilizar las cajas con recuentos cercanos a 300, multiplicar el promedio por el recíproco de la dilución empleada y reportar como recuento estimado.

Cuando hay más de 300 colonias en todas las placas, seleccionar la menor dilución y contar las colonias en 13 cuadros de 1 cm<sup>2</sup>. Seleccionar 7 cuadros verticales y 6 horizontales, para obtener un promedio. Multiplicar este promedio por el área total de la caja, que puede ser de 57 cm. para cajas de plástico o 65 cm. para cajas de vidrio y por el factor de dilución.

Cuando las cajas sobrepasan las 100 colonias por cm<sup>2</sup>, se debe reportar el resultado como mayor que 6500 ó 5700 veces la dilución más alta, según sea caja de vidrio o de plástico respectivamente.

Se deben redondear los conteos a dos cifras significativas únicamente en el momento de la conversión a recuento aeróbico en placa. Cuando se redondeen los números, elevar el segundo dígito al próximo número más alto solamente cuando el tercer dígito de la izquierda es más alto y reemplace el número eliminado con un cero. Si el tercer dígito es cuatro o menos, reemplazar el tercer dígito con cero y dejar el mismo segundo dígito.

Para reportar los resultados, estos se deben nombrar como Unidades formadoras de colonia por gramo o mililitro (UFC/g ó ml). Se debe informar el método de inoculación (vertido en placa o esparcido), la temperatura, las horas de incubación y el nombre del agar de recuento.

## ANEXO 4

***Comparación de los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas al bacilo Gram positivo hallado en la muestra A5 con B. cereus y B. anthracis***

Pruebas realizadas	Muestra A5	<i>B. cereus</i>	<i>B. anthracis</i>
Tinción de Gram	Bacilos Gram positivo	Bacilos Gram positivo	Bacilos Gram positivo
Movilidad	-	+	-
Reducción de nitratos	+	V	+
Lecitinasa	+	+	+
Indol	-	-	-
Crecimiento en 6% de NaCl	-	V	-
Voges Proskauer	-	V	V
Esculina	+	V	V
Hidrólisis de gelatina	-	+	+
Fermentación de maltosa	+	+	+
Fermentación de sacarosa	-	V	+
Fermentación de glucosa	+	+	+
TSI	K/A	V/A	V/A



