

Diseño docente para la realización de prácticas de control de la calidad microbiológica de productos cosméticos y de dermofarmacia

**Antonio Santos de la Sen. Belén Patiño Álvarez.
Covadonga Vázquez Estévez. Domingo Marquina Díaz.**

Departamento de Microbiología III. Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad Complutense de Madrid. C/ José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid.
ansantos@bio.ucm.es belenp@bio.ucm.es covi@bio.ucm.es dommarq@bio.ucm.es

Resumen: En este artículo se describen los métodos básicos para el desarrollo de unas prácticas de control microbiológico de la calidad de productos cosméticos en un laboratorio básico de microbiología. Se hace especial mención a las técnicas específicas, las poblaciones microbianas más significativas a determinar y a la normativa básica de aplicación para este tipo de productos.

Palabras clave: Control de la calidad. Cosméticos. Dermofarmacia. Microbiología.

INTRODUCCIÓN AL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LA CALIDAD DE PRODUCTOS COSMÉTICOS Y DE DERMOFARMACIA

El profesional responsable de la producción de **cosméticos** debe asegurar que los productos que suministra son de calidad, seguros y eficaces. Para lograr este objetivo son múltiples los análisis que se realizan sobre las materias primas empleadas y los productos finales. Entre esos análisis, el **control microbiológico** se considera de gran importancia ya que en estos productos, ricos en componentes susceptibles de ser empleados por los microorganismos como fuente de nutrientes, se pueden presentar las condiciones necesarias para la multiplicación de microorganismos capaces de deteriorar el producto o, incluso, afectar la salud del consumidor. Las consecuencias económicas derivadas de todo ello son múltiples ya que la detección del desarrollo microbiano en cosméticos supone la retirada de lotes completos del producto acabado, afecta a la imagen de marca y, por último, puede tener consecuencias sanitarias, puesto que no son pocos los microorganismos potencialmente patógenos capaces de desarrollarse en productos cosméticos.

Definición

Los **cosméticos, productos de higiene y perfumes** son “preparaciones constituidas por sustancias naturales o artificiales, de uso externo en las diversas partes del cuerpo humano, piel, sistema capilar, uñas, labios, órganos genitales

externos, dientes y membranas mucosas de la cavidad oral, con el objetivo exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, alterar su apariencia y/o corregir olores corporales y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado” (R.D.209/2005). Bajo esta definición se encuentran una infinidad de productos susceptibles de presentar **contaminación microbiológica** fundamentalmente debido a su composición rica en productos nutritivos como extractos de placenta, colágeno, vitaminas, aceites, etcétera. Productos muchas veces de cuestionable efectividad sobre la piel, pero que sin embargo aportan a los microorganismos un sustrato idóneo para su crecimiento y multiplicación. La clasificación de cosméticos, productos de higiene y otros de naturaleza y finalidad idénticas está basada en el Real Decreto 209/2005, de 25 de febrero, por el que se modifica el Real Decreto 1599/1997, de 17 de octubre, sobre productos cosméticos (BOE 26.2.2005) y corrección de errores (BOE 13.4.05). El órgano encargado de velar por su cumplimiento es la **Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios**, Subdirección General de Productos Sanitarios.

Consideraciones generales para la manipulación de las muestras antes de realizar el análisis microbiológico

El Manual de Bacteriología Analítica (Bacteriological Analytical Manual (BAM)) indica una serie de recomendaciones para la manipulación de las muestras de productos cosméticos que van a ser sometidos a un análisis microbiológico. Estas recomendaciones resumidas son las siguientes:

- Una vez que se recibe una muestra de un producto cosmético, ésta se debe **analizar lo más pronto posible**, sin embargo, cuando es necesario almacenarla se debe hacer en un lugar limpio que se encuentre a temperatura ambiente. Las muestras nunca se deben incubar, refrigerar o congelar antes o después de su análisis microbiológico.
- Es importante **inspeccionar cuidadosamente el aspecto** que presenta la muestra en el momento que se recibe y se debe anotar cualquier irregularidad que se observe en el envase. Los envases pueden presentar poros, roturas, agujeros por los cuales el producto de su interior es expuesto al exterior y puede sufrir una contaminación microbiológica que nada tiene que ver con las condiciones de fabricación.
- Antes de abrir el envase para tomar la muestra del producto y realizar el análisis microbiológico se **debe desinfectar su superficie** con soluciones desinfectantes (ej. etanol al 70% (v/v), iodo al 4% (p/v) en etanol 70% (v/v), etc.). Si es necesario después de desinfectarlas se debe secar el envase con una gasa estéril para no exponer el producto a la solución desinfectante.
- Para hacer el análisis microbiológico es importante utilizar una **porción representativa** del contenido de la muestra. Cuando se trata de productos que contienen menos de 1 g o menos de 1 mL, se debe analizar el contenido completo del envase.

- Cuando se dispone de una sola muestra a la que se deben realizar otros ensayos (químico, toxicológico, etc.), se debe **tomar primero la parte de muestra que va a ser utilizada en el análisis microbiológico**. En este caso la cantidad de muestra a tomar, dependerá del contenido total del producto. Si la muestra es demasiado pequeña (1-2 ml) se analizará todo el contenido del envase.
- Todas las **manipulaciones de la muestra se deben realizar asépticamente**. Preferiblemente el análisis microbiológico se realizará bajo campana de flujo laminar, sin embargo, si no es posible, se pueden acondicionar otros métodos de trabajo en esterilidad como el trabajo cerca de un mechero tipo bunsen.
- Cuando se preparan muestras cosméticas para la realización de un análisis microbiológico, es importante garantizar que los microorganismos, que pudiesen estar como contaminantes, van a ser detectados y que el analista, durante la realización del ensayo, no aporta ningún tipo de contaminante. Para ello es importante incorporar completamente la muestra obtenida en el medio de cultivo empleando técnicas asépticas.

Análisis microbiológico en materias primas y productos cosméticos

Los productos cosméticos emplean multitud de materias primas que deben ser analizadas. El control microbiológico de las materias primas no suele diferir sustancialmente del control realizado para el producto final; teniendo en cuenta las siguientes consideraciones generales en el análisis de una materia prima: composición química, naturaleza física, origen y disponibilidad, uniformidad de lote, uso destinado del producto, concentración de la materia usada en el producto, procesos de manufactura, historia de la materia prima, condiciones de almacenamiento, etc.

Entre las materias primas el agua es la única de uso casi generalizado para la elaboración de cosméticos. La industria cosmética tiene que usar agua y sistemas de agua validados y controlados.

A continuación se presentan instrucciones para realizar la toma de la muestra y la incorporación de la muestra al medio de cultivo de diferentes tipos de productos cosméticos. Dependiendo del procedimiento empleado para tomar la muestra (pesar o medir el volumen) se expresarán los resultados de los recuentos microbianos como UFC por gramo o por ml de muestra.

- **Cosméticos en soluciones acuosas** (champús, acondicionadores, tónicos, lociones, baños de crema, espumas de baño, etc.). Toma de la muestra: medir directamente el volumen de muestra deseado utilizando una pipeta estéril y luego colocarla en el frasco que contiene el medio de cultivo.
- **Cosméticos sólidos y polvos** (jabones, desodorantes en barra, polvos faciales compactos, coloretes, sombras, etc.). Toma de la muestra: raspar

asépticamente la muestra con una espátula estéril sobre un recipiente estéril (placa de Petri). De allí tomar y pesar asépticamente la muestra con una espátula y colocarla en el frasco que contiene el medio de cultivo hasta alcanzar el peso deseado.

- **Delineadores y máscaras para pestañas a prueba de agua.** Toma de la muestra: Con este tipo de productos se hace difícil la extracción de la muestra del envase que la contiene, por lo que para realizar el ensayo se limpia con una espátula estéril la muestra que queda adherida al aplicador una vez que éste ha entrado en contacto con el producto dentro del envase (cepillo o pincel) y se va colocando en un tubo con tapa de rosca estéril. Este procedimiento se repite hasta obtener una cantidad representativa de la muestra. Si no es posible obtener toda la muestra requerida para el ensayo, se pesa exactamente lo que pueda ser extraído del envase y se completa con el medio de cultivo hasta obtener la proporción muestra-medio de cultivo deseado.
- **Productos en aerosol** (desodorantes, lacas, talcos, bronceadores, etc.). Toma de la muestra: Después de descontaminar la válvula, con una gasa humedecida con una solución de alcohol de 70%, expeler directamente el contenido del aerosol al frasco que contiene el medio de cultivo hasta alcanzar el peso/volumen deseado. Al seguir este procedimiento hay que trabajar con mucha precaución, ya que la técnica indica que hay que trabajar cerca del mechero y generalmente estos productos contienen gases inflamables que pueden incendiarse con facilidad. Para evitar este problema se pueden seguir otros procedimientos como expeler el producto a un recipiente estéril bajo una campana de flujo laminar y desde ese recipiente tomar la muestra como si se tratara de un producto cosmético líquido, en polvo, etc. según sea el caso.

Nota: Para todos aquellos productos con base liposoluble (los labiales, delineadores y máscaras para pestañas a prueba de agua -materiales anhidros-), siempre es necesario hacer un tratamiento previo mezclando el producto cosmético con Tween-80 para lograr que el cosmético se pueda dispersar/emulsionar en el medio de cultivo, que siempre presenta naturaleza acuosa.

Limites microbiológicos para productos cosméticos

Los valores recogidos en este compendio resumen los reglamentos que tienen por objeto establecer las pruebas analíticas de control que deben ser evaluadas para comprobar la calidad de los cosméticos y, asegurar a la comunidad que mantienen inalterables sus características iniciales.

Hay que tener en cuenta criterios como uso del producto, ruta de administración y población objetivo cuando se establecen guías microbiológicas para seguridad y eficacia. Dado que los “productos cosméticos” no son productos estériles, pueden sufrir contaminación microbiana por el ambiente, materia prima, componentes, etc. Las formulaciones que pueden soportar microorganismos y son susceptibles de

contaminación microbiana deben contener conservantes para retardar el crecimiento microbiano. Los cosméticos deben presentar lo que se denomina una **esterilidad de tipo industrial**, que no es una **esterilidad absoluta**. Esta esterilidad industrial permite la existencia de cierta cantidad de microorganismos siempre y cuando estos no sean de carácter **patógeno**. Para determinar si el cosmético cumple con estos criterios se realizan los “**test de todo o nada**” que comprenden dos fases. La primera consiste en realizar el **bloqueo de los conservantes** del producto cosmético para poder realizar el **enriquecimiento** de los microorganismos y la segunda consiste en el análisis de los microorganismos enriquecidos para determinar que no existen microorganismos patógenos.

Se recomienda que los equipos utilizados en los procesos de fabricación de los cosméticos estén diseñados para una fácil limpieza y **sanitización**; así como aplicar las buenas prácticas de manufactura para evitar accidentes humanos o contaminación microbiana ambiental durante la manufactura. Es responsabilidad de los fabricantes asegurarse que ningún microorganismo presente sea capaz de crecer en el producto y que las especies y cantidad de microbios no representen un peligro al consumidor cuando se usa el producto tal cual se indica. Además, ningún microorganismo presente debe comprometer la estabilidad del producto.

Criterios específicos

A continuación presentamos los diferentes límites utilizados por las principales organizaciones que regulan la industria cosmética a nivel mundial.

- **Límites microbianos CTFA** (The Cosmetics, Toiletry, and Fragrance Association)

Límites cuantitativos. En productos para bebés, menos de 100 ufc/g o ufc/mL. En productos para el área de los ojos menos de 100 ufc/g o ufc/mL. Resto de productos menos de 1000 ufc/g o ufc/mL.

Límites cualitativos. Ausencia de los patógenos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

- **Límites microbianos en la Comunidad Europea**

En este caso se definen dos categorías de cosméticos: **Categoría 1:** Productos dirigidos a niños menores de 3 años, área de los ojos y membranas mucosas. **Categoría 2:** Otros productos.

Límites cuantitativos. Categoría 1: Recuento total de **microorganismos viables aeróbicos mesófilos**: menos de 100 ufc/g o mL en 0.5 g o mL de producto. **Categoría 2:** Recuento total de microorganismos viables aeróbicos mesófilos: menos de 1000 ufc/g o mL en 0.1 g o mL de producto.

Limites cualitativos. *Ps. aeruginosa*, *S. aureus* y *Candida albicans* son considerados los principales patógenos potenciales en productos cosméticos. En las pruebas específicas estos patógenos no deben ser detectados en 0.5 g o mL en aquellos productos cosméticos de la categoría 1 y en 0.1 g o mL en cosméticos de categoría 2.

OBJETIVO

Desarrollo de un grupo de prácticas para el conocimiento, por parte de los alumnos, de las técnicas empleadas en el control microbiológico de la calidad de productos cosméticos y de dermofarmacia.

LA PRÁCTICA

Según Perkins, en su texto “Conocimiento como Diseño”, la pedagogía se debe realizar de manera crítica, reflexiva y creativa; en donde los saberes disciplinares confluyen en un proyecto de diseño, coherente con las premisas actuales del conocimiento. La pedagogía en sí misma es un elemento móvil y activo de nuestra sociedad, y sin esa movilidad, la educación tiende a anquilosarse y a convertirse en un conocimiento árido y sin sentido. En este sentido el actual proyecto docente plantea la realización de unas prácticas eminentemente dirigidas a los aspectos más aplicados de la microbiología facilitando así una formación en un ámbito de gran importancia en la industria actual, [El Control Microbiológico de la Calidad](#).

Las prácticas que presentamos recogen un grupo de experiencias para su realización en un laboratorio básico de microbiología, pero bien pudieran ser un fiel reflejo de lo que a otra escala pudiera realizarse en una industria cosmética. Las cuatro prácticas planteadas, estudiadas y realizadas por el alumno de forma independiente, darán al alumno una formación muy dirigida a lo que será su actividad laboral. Estas prácticas son:

- Práctica 1. Control de conservantes de un producto cosmético.
- Práctica 2. Control de ambiente y desinfección.
- Práctica 3. Análisis microbiológico de aguas.
- Práctica 4. Análisis microbiológico de un producto cosmético.

Práctica 1. Control de conservantes de un producto cosmético

Los cosméticos y productos de [dermofarmacia](#), como productos susceptibles del ataque microbiano, durante su fabricación son suplementados con una serie de productos [conservantes](#) que les protegen de una contaminación de tipo secundario, es decir, la aportada por el consumidor durante su uso. Si bien la reglamentación establecida para el uso de estos productos es muy extensa, su fin único es el proteger el producto. En todos los casos los productores de cosméticos buscan adicionar la

menor cantidad de conservante con el fin de abaratar costes y de reducir la incidencia de los procesos alérgicos que los conservantes pueden desencadenar en los usuarios.

En la presente práctica los alumnos determinarán si ciertos productos cosméticos presentan una protección adecuada frente a diversos microorganismos que interesa evitar, los denominados [microorganismos índice](#).

El procedimiento a realizar, denominado [crown test](#), se resume en la figura 1. La práctica consiste en sembrar diferentes microorganismos (*E. coli*, *S. aureus*, *M. luteus*, etc.) en placas de medio [TSA](#) (tripticosa Soja Agar) y posteriormente practicar dos pocillos en el medio para depositar el cosmético.

Tras la incubación en nevera durante 2 horas, para que los conservantes difundan, las placas se incubarán a 37°C para el desarrollo de los microorganismos. La protección del cosmético se evaluará a las 24-48 h por la aparición de halos de inhibición del crecimiento alrededor de los pocillos (Fig. 1).

Práctica 2. Control de ambiente y desinfección

Durante los procesos de producción de cosméticos, así como de otros productos alimentarios, farmacéuticos y microbiológicos, el [control microbiológico del ambiente](#) o entorno de fabricación, así como de los procedimientos de [limpieza y desinfección](#) de las zonas de procesamiento, es muy importante, ya que el entorno de trabajo también es una fuente importante de contaminación microbiana.

La figura 2 resume los procedimientos a seguir durante dichos análisis. El control de ambiente será un control de tipo cualitativo ya que interesa saber si el entorno está contaminado o no, y no el nivel de contaminación, ya que el procesamiento se realiza para evitar una contaminación excesiva.

El control de ambiente se realizará situando 2 placas de medio TSA en algún punto del laboratorio de prácticas (simulando la zona de producción del cosmético), las placas se abrirán durante 15 y 30 minutos recogiendo los microorganismos del entorno. Se evaluará, tras la incubación a 37°C, la contaminación ambiental de cada zona de trabajo.

Por otro lado, [el control de desinfección](#) es un proceso cuantitativo que se realizará procediendo a la toma de muestras, con [placas de contacto](#) o [placas Rodac](#), de superficies de trabajo para posteriormente realizar un proceso de desinfección con distintos agentes (alcohol 96º, alcohol 70º, lejía, detergente, etc.).

Tras el proceso de desinfección se realizará la toma de una segunda muestra de la misma zona para evaluar la distinta eficacia de los agentes desinfectantes.

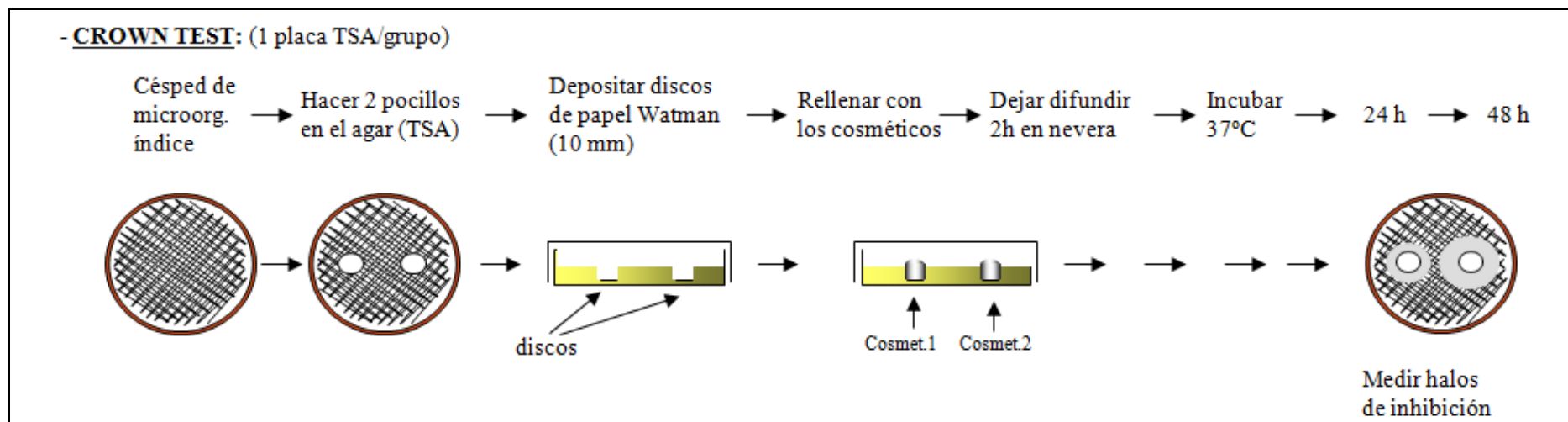


Figura 1. Realización de la primera práctica para el análisis de la protección por conservantes de productos cosméticos.

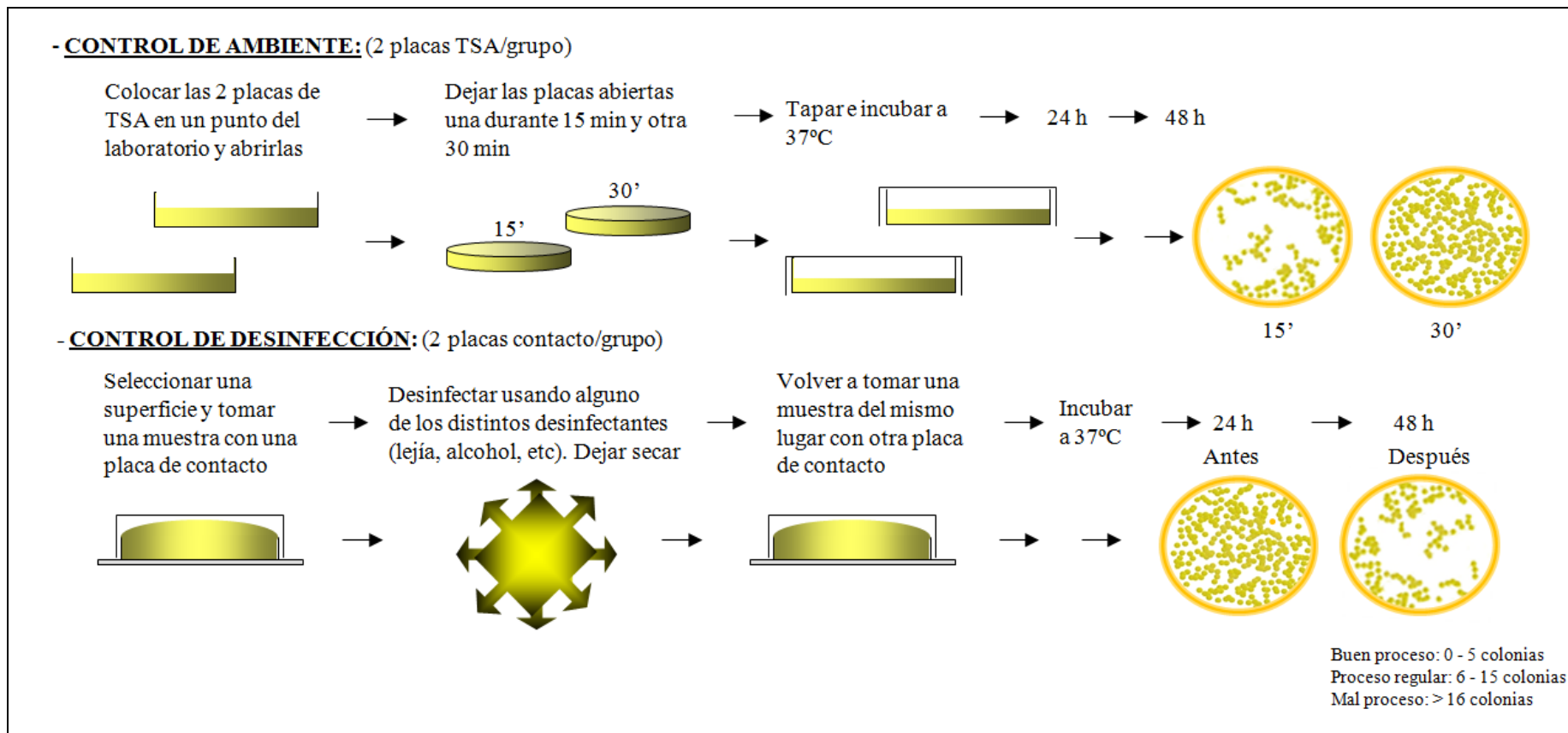


Figura 2. Realización de la práctica para el control de ambiente y desinfección de entornos de fabricación de productos cosméticos.

Práctica 3. Análisis microbiológico de aguas

Las aguas de consumo son vehículo de multitud de microorganismos, muchos patógenos, y dichas aguas pueden ser utilizadas como materia prima para la elaboración de productos cosméticos. Si bien es cierto que las aguas de consumo no son empleadas habitualmente para este fin sin antes haber realizado un tratamiento previo de purificación (filtración, esterilización con luz UV, etc.) que asegure la calidad del agua empleada, se hace necesario un control microbiológico que asegure que estos procesos de purificación son eficaces.

En el agua la presencia de patógenos viene habitualmente determinada por la presencia de contaminación fecal. La detección de la misma se realiza a través de la detección de una serie de poblaciones microbianas indicadoras: **coliformes totales y fecales** (colimetría), **estreptococos fecales** (estreptometría) y **clostridios sulfito-reductores** (clostridiometría). Simultáneamente se realizará también un recuento en TSA de **bacterias totales mesófilas** y **psicrotrofas** (Fig. 3).

Toda la metodología empleada para las determinaciones de poblaciones específicas están recogidas en las Figs. 3, 4, 5 y 6.

Para la colimetría se realizará la técnica del **número más probable de microorganismos** (NMP) sembrando en medio de **caldo lactosado**. Este es un método estadístico que consiste en determinar con un margen de confianza el número de microorganismos aproximado que existe en una muestra. Se usa el medio de caldo lactosado porque en él los microorganismos coliformes utilizarán la lactosa propiciando un viraje de color en el medio (de púrpura a amarillo) con la producción de gas (recogido en la **campana durham**).

Posteriormente, la contaminación fecal se confirmará (pruebas confirmativas) mediante la siembra en **medio EAM** (eosina azul de metileno) para la determinación de los coliformes totales y en medio EC (*Escherichia coli*) para los coliformes fecales.

En el medio EAM, **medio selectivo y diferencial**, los coliformes se diferencian por la formación de colonias de color opaco y violeta oscuro; simultáneamente el resto de la **microflora acompañante** es inhibida por los componentes del medio. Además, en el caso particular de *E. coli*, se aprecia un color verde brillante característico.

El **medio EC** es un medio líquido que contiene lactosa y una campana durham. El crecimiento positivo a 44°C con la formación de gas denotará la presencia de coliformes fecales.

Por último, en este apartado se realizará una caracterización de las cepas aisladas mediante las pruebas de la **catalasa** y la **oxidasa**, que ambas deben ser negativas en las bacterias coliformes. Con los resultados positivos confirmados iremos a las tablas de NMP para conocer la carga microbiana coliforme (Fig 4).

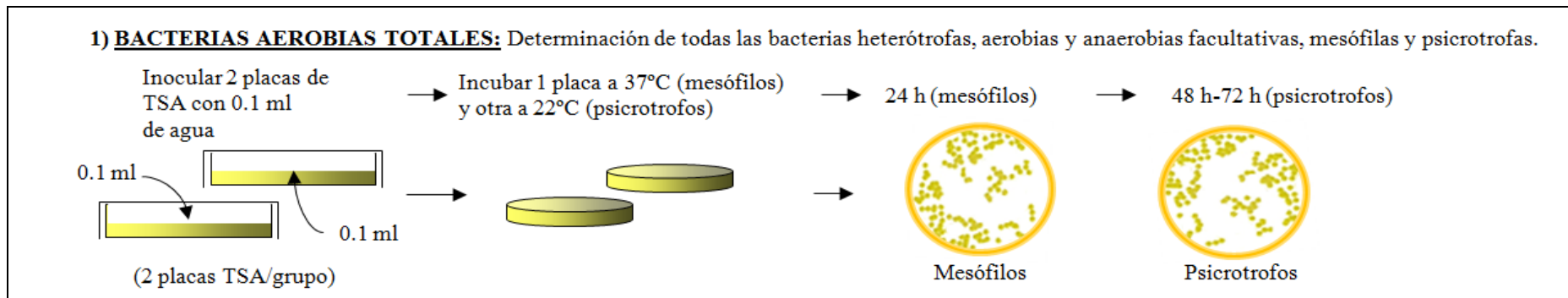


Figura 3. Recuento de viables totales mesófilos y psicrotrofos en muestras de agua.

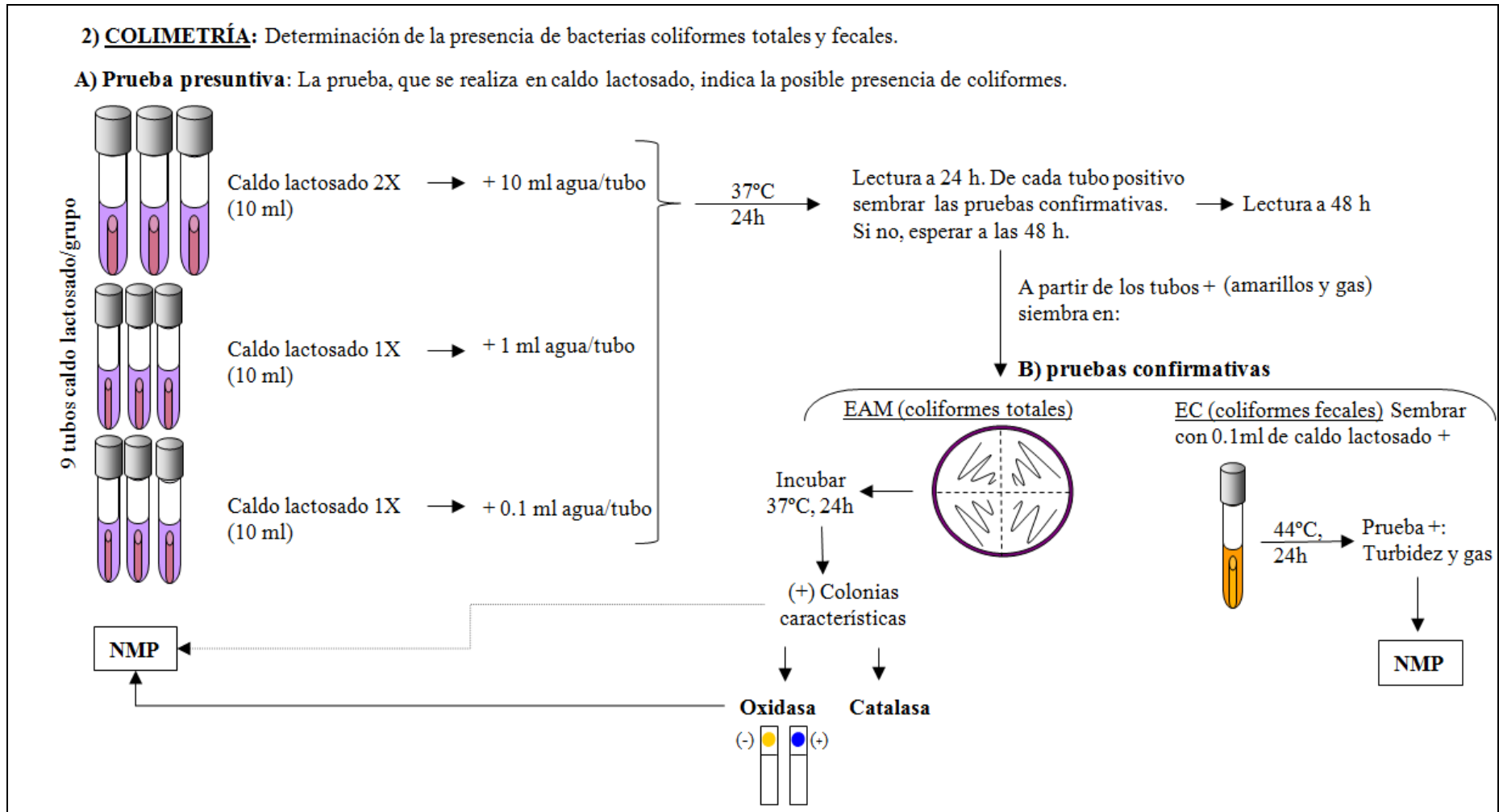


Figura 4. Recuentos de microorganismos coliformes totales y fecales por el número más probable de en muestras de aguas.

Para la estreptometría se recurrirá a la determinación del número de microorganismos mediante el método de filtración y recuento en el medio selectivo de **Slanetz**. Este medio es un medio selectivo y diferencial en el cual la presencia de **azida** (inhibidor respiratorio) inhibe a la flora acompañante y la presencia de una **sal de tetrazolio** permite detectar los estreptococos fecales por su coloración “rojo ladrillo” debido a la reducción y acumulación de la sal de tetrazolio en su interior (Fig. 5).

Por último, se determinará la clostridiometría mediante el empleo de un método selectivo (Fig. 6). Microorganismos que sean sulfito-reductores hay muchos en la naturaleza, sin embargo, que además sean esporulados como los *Clostridium* hay muy pocos. Por ello, el método consiste en calentar el agua a 80°C, que sólo resistirán los microorganismos esporulados y posteriormente sembrar en el medio selectivo y diferencial de **SPS**, en el cual, los sulfito-reductores generan colonias negras por la reducción del sulfito a sulfuro que, a su vez, reacciona con una sal de hierro del medio originando un precipitado de color negro.

Se harán recuentos a 24-48h para determinar las colonias negras típicas, otras colonias corresponderán a esporulados no sulfito-reductores como las bacterias del género *Bacillus*.

Práctica 4. Análisis microbiológico de un producto cosmético

Debido a su composición los cosméticos son susceptibles de contaminación microbiana pese al uso de conservantes. Este hecho hace indispensable la realización de unos controles de los mismos para evitar las infecciones y perjuicios derivados del uso de cosméticos contaminados, así como evitar en lo posible el biodeterioro de los productos cosméticos.

Como ya se ha comentado, en los cosméticos se permite la existencia de cierta cantidad de microorganismos siempre y cuando estos no sean de carácter patógeno. Para determinar si el cosmético cumple con estos criterios se realizan los “test de todo o nada” que consisten en dos fases.

La primera consiste en realizar el **bloqueo de los conservantes** del producto cosmético y el **enriquecimiento** de los microorganismos presentes, y la segunda, que consiste en el análisis de los microorganismos enriquecidos para determinar que no existen patógenos (Fig 7).

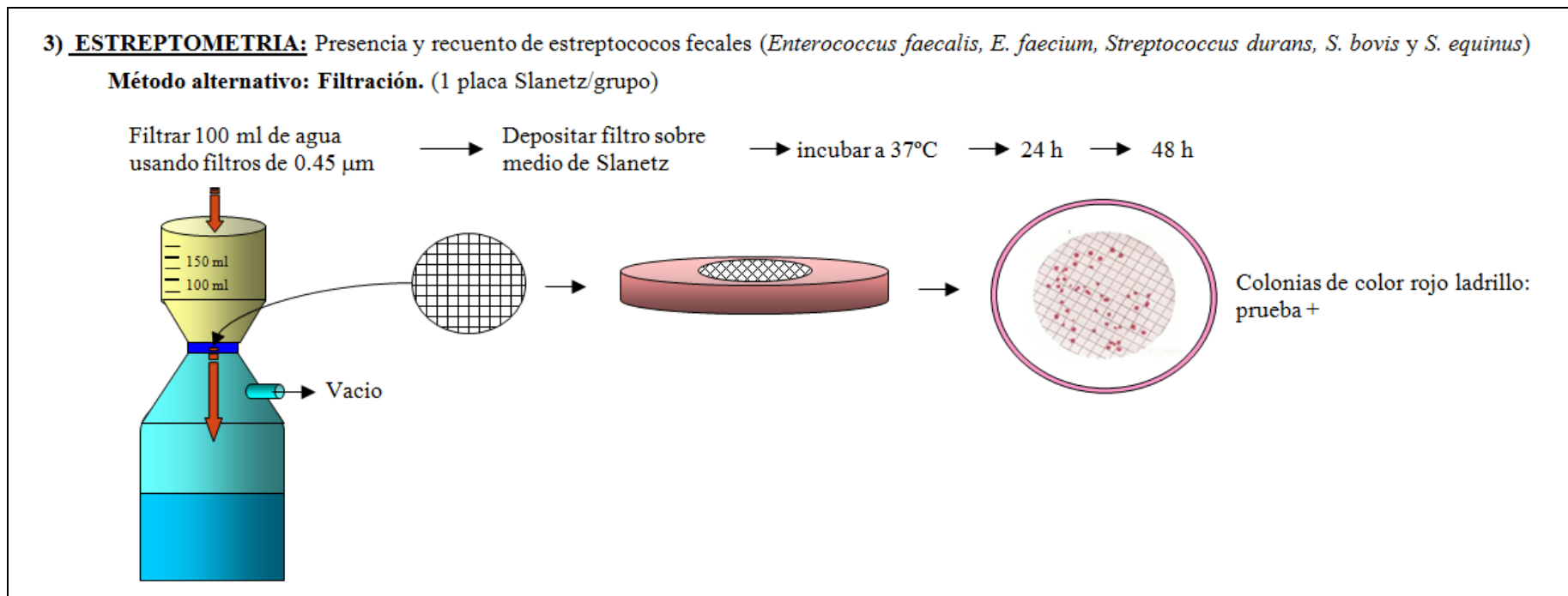


Figura 5. Detalles experimentales de la práctica para la determinación de estreptococos fecales. El método consiste en filtrar el agua usando un filtro de 0,45 μm de poro. Las bacterias quedarán retenidas en el filtro que, a su vez, será depositado sobre la superficie del medio de Slanetz.

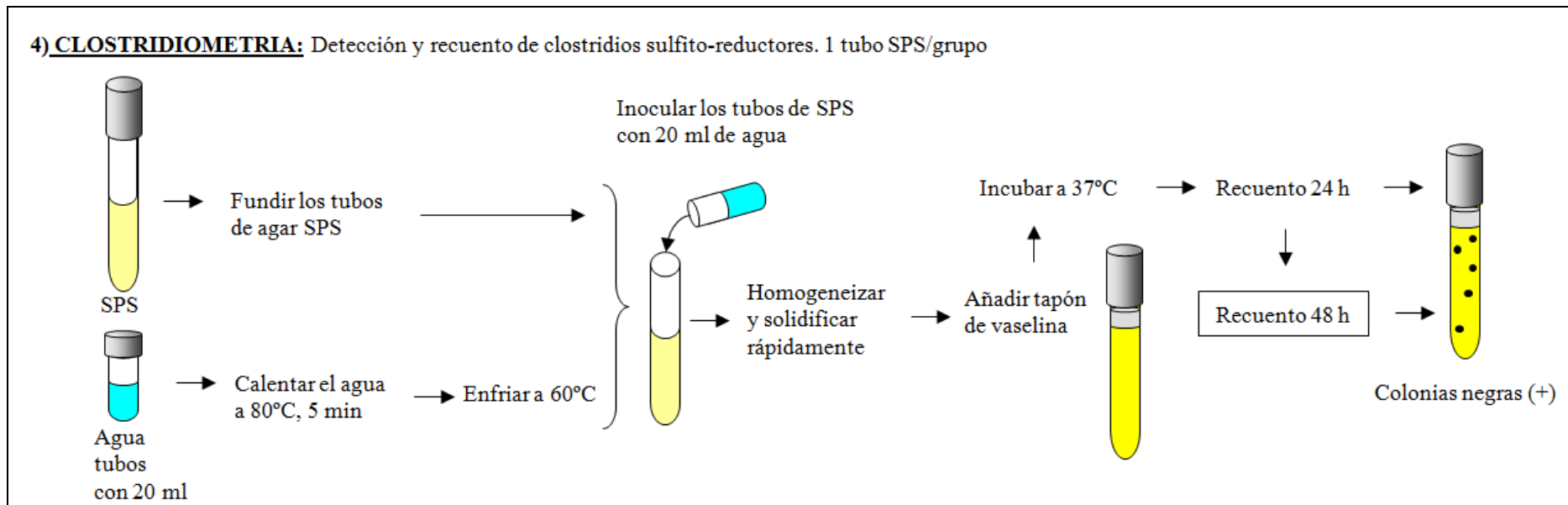


Figura 6. Detalles experimentales de la práctica para la determinación de clostridios sulfito-reductores.

La práctica 4 se desarrolla, en base a lo anterior, en dos fases. La primera de ellas, **prueba presuntiva**, consiste en inocular los cosméticos en un medio inactivador de conservantes que simultáneamente permite el desarrollo de los microorganismos (**medio Dey-Engley**).

Desde este medio se procede a, por un lado, realizar un recuento de bacterias mesófilas, psicrotrofas, hongos y levaduras, y por otro se incuba a 37°C para mediante un enriquecimiento permitir posteriormente la determinación de especies potencialmente patógenas (coliformes fecales, estreptococos fecales, *Ps. aeruginosa* y *S. aureus*).

Los medios empleados para todo ello son: el medio **Sabouraud-Rosa de Bengala-cloranfenicol** que permite el recuento de hongos y levaduras con la inhibición simultánea de las bacterias por el uso del antibiótico cloranfenicol.

El medio **agar cetrimida** para la detección de *Ps. aeruginosa*; en el cual la presencia de cetrimida (detergente) impide el crecimiento de otros microorganismos y permite visualizar bajo la luz UV la producción de un pigmento verde fluorescente característico de *Ps. aeruginosa*.

Por último, el medio **agar manitol-Sal** permite detectar la presencia de *S. aureus* por la presencia en el medio de manitol como fuente de carbono y una elevada concentración salina que impide crecer a otros microorganismos. La capacidad de *S. aureus* de fermentar el manitol se pone de manifiesto con la presencia de un indicador de pH que vira de rojo a amarillo. Las colonias amarillas con halo amarillo serán características de *S. aureus*.

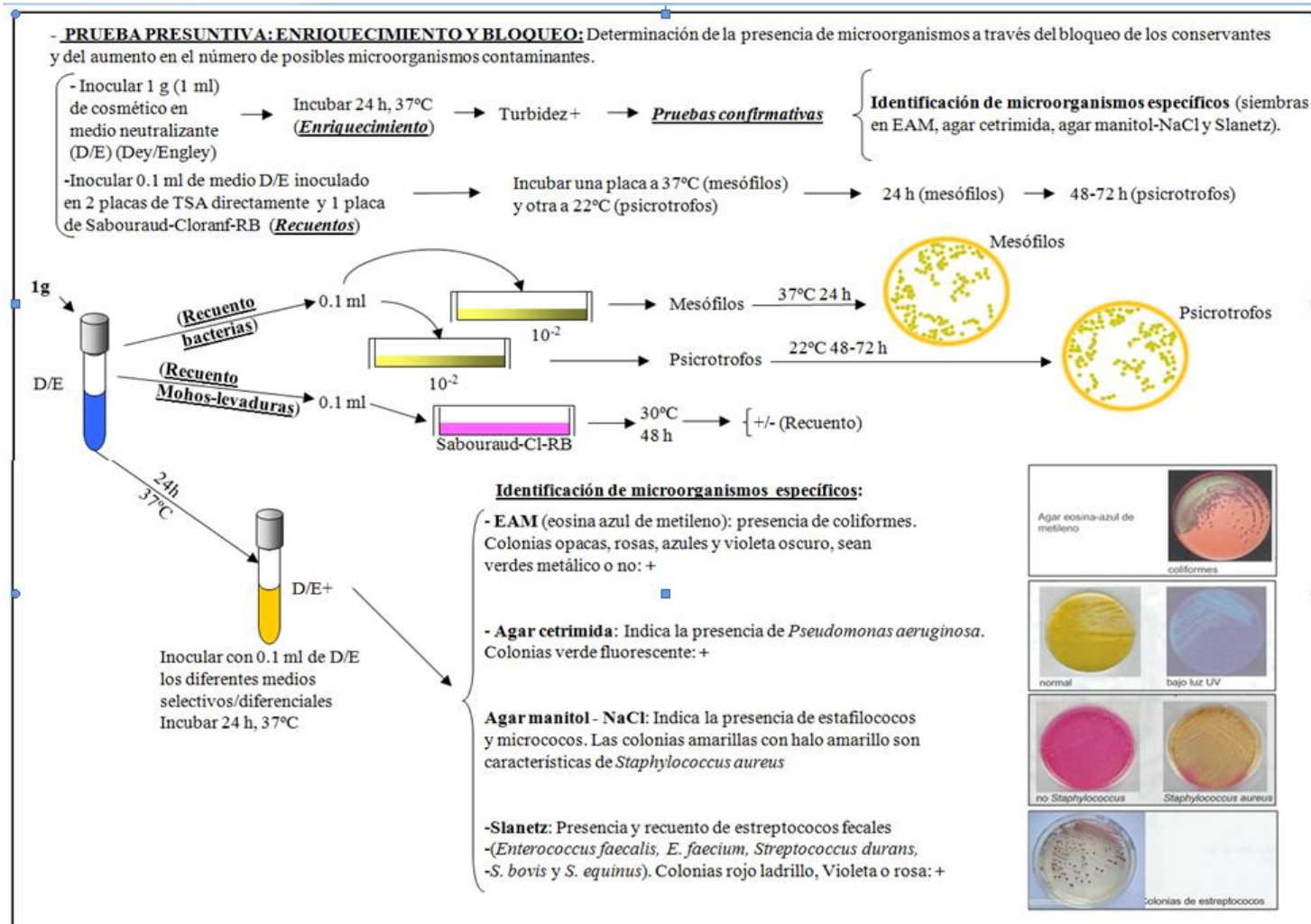


Figura 7. Detalles de la práctica para el recuento de microorganismos en un producto cosmético y la determinación de poblaciones microbianas potencialmente peligrosas.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

- Anonymous. 1990. Antimicrobial preservatives - effectiveness. En: *United States Pharmacopeia*. 22nd Revision, p. 1478. U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- AOAC INTERNATIONAL. 2000. *Official Methods of Analysis*. 17th ed., Method 998.10. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD.
- De Navarre, M.G. 1941. *The Chemistry and Manufacture of Cosmetics*. Van Nostrand, New York.
- Dunningan, A.P. 1968. Microbiological control of cosmetics. *Drug Cosmet. Ind.*, 102: 43-45, 152-158.
- Ewing, W.H. 1986. Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier, New York.
- Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Costilow, R.N.; Nester, E.W.; Wood, W.A.; Krieg, N.R. y Phillips, G.R.. 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Hitchins, A.D. 1993. Cosmetic preservation and safety: FDA Status. *J. Assoc. Food Drug Officiald*, 57: 42-49.
- Madden, J.M. 1984. Microbiological methods for cosmetics, pp. 573-603. En: *Cosmetic and Drug Preservation: Principles and Practice*. J.J. Kabara (ed). Marcel Dekker, New York and Basel.
- Smart, R., y D.F. Spooner. 1972. Microbiological spoilage in pharmaceuticals and cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 23: 721-737.
- Tran, T.T., y Hitchins, A.D. 1994. Microbiological survey of shared-use cosmetic test kits available to the public. *J. Ind. Microbiol.*, 13: 389-391.
- Tran, T.T.; Hitchins, A.D. y Collier, S.W. 1990. Direct contact membrane method for evaluating preservative efficacy in solid cosmetics. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 12: 175-183.
- Wilson, L.A., y Ahearn, D.G. 1977. *Pseudomonas*-induced corneal ulcers associated with contaminated eye mascaras. *Am. J. Ophthalmol.*, 84: 112-119.
- Wilson, L.A.; Jilian, A.J. y Ahearn, D.G. 1975. The survival and growth of microorganisms in mascara during use. *Am. J. Ophthalmol.*, 79: 596-601.

RECURSOS ELECTRÓNICOS

US Department of Health & Human Services

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm073598.htm>

Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association (CTFA)

<http://www.personalcarecouncil.org/>

Legislación de la Subdirección General de Productos Sanitarios

<http://www.agemed.es/actividad/legislacion/espana/sanitarios.htm#cosmeticos>

Recibido: 9 julio 2009.

Aceptado: 14 julio 2009.