

NOTA IMPORTANTE:

La entidad sólo puede hacer uso de esta norma para si misma, por lo que este documento NO puede ser reproducido, ni almacenado, ni transmitido, en forma electrónica, fotocopia, grabación o cualquier otra tecnología, fuera de su propio marco.

ININ/ Oficina Nacional de Normalización

NORMA CUBANA

Obligatoria

NC

68: 2007

COSMÉTICOS — LÍMITE MICROBIANO — DETERMINACIONES

Cosmetics — Microbial limit — Determinations

ICS: 71.100.70; 07.100.99

**2. Edición Noviembre 2007
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA**

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La Habana. Cuba. Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio Web: www.nc.cubaindustria.cu



Cuban National Bureau of Standards

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada por el Comité Técnico de Normalización NC/CTN 52 de Cosméticos y Agentes Activos de Superficie, integrado por representantes de las entidades siguientes:

Ministerio de la Industria Ligera	Centro Nacional de Control de los Medicamentos
Ministerio del Comercio Interior	Centro Nacional de Medicina Natural y Tradicional
Ministerio de las Fuerzas Armadas Revolucionarias	Laboratorio Biológico Farmacéutico
Oficina Nacional de Normalización	Corporación TRD Caribe
Unión Suchel	Corporación CIMEX S, A.
Instituto de Investigaciones en Normalización	Corporación Cubalce
Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos	

- Sustituye a la NC 68: 2000 Perfumería y Cosméticos. Límites Microbianos. Determinaciones (1ra. edición). Esta nueva edición ha sido actualizada, a partir de parámetros reflejados en las normativas más recientes.

- Consta de los anexos A y B.

© NC, 2007

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, Vedado, Ciudad de La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

COSMÉTICOS — LÍMITE MICROBIANO — DETERMINACIONES

1 Objeto

Esta Norma Cubana establece los límites microbianos máximos permisibles y los métodos de ensayo para su determinación.

Es aplicable a las materias primas, productos cosméticos y productos infantiles, que sean susceptibles a la contaminación por microorganismos.

2 Referencias normativas

Los siguientes documentos de referencia son indispensables para la aplicación de esta Norma Cubana. Para las referencias fechadas, sólo es aplicable la edición citada.

NC-ISO 3696: 2004 Agua para uso en análisis de laboratorio. Especificaciones y métodos de ensayo.

NC-ISO 2859-2: 2003 Procedimiento de Muestreo para la Inspección por Atributos. Parte 2: Planes de Muestreo Indexados en la Calidad Limite (CL) para la Inspección de lotes Aislados.

3 Términos y definiciones

A los fines de este documento se aplican los términos y las definiciones siguientes:

3.1

condiciones de asepsia

requisitos de higiene y limpieza que deben existir en un área de producción, en un laboratorio o en un almacén de esta actividad para evitar la contaminación microbiana de los productos.

3.2

microorganismo indeseable

microorganismo capaz de producir lesiones o enfermedades al usuario o de alterar las propiedades organolépticas de los productos.

3.3

enterobacteria

bacilo aerobio o anaerobio facultativo, fermentativo de la glucosa, metabolismo respiratorio y fermentativo, catalasa positivo, oxidasa negativo y reductor de nitrato a nitrito.

3.4

hongo

microorganismo filamentosos multicelular, con micelios coloreados o no y unicelular de formas variadas.

3.5 producto de alto riesgo

aquel que permite la supervivencia y crecimiento microbiano por su alto contenido de agua, junto a componentes de la formulación que puedan ser utilizados como nutrientes.

3.6**producto de bajo riesgo**

aquel que permite la supervivencia durante poco tiempo y no hay multiplicación microbiana.

3.7**unidad formadora de colonia**

área de células de microorganismos que pueden verse a simple vista y que se origina a partir de una célula simple.

4 Requisitos**4.1 Materias primas**

Para las materias primas utilizadas en la elaboración de productos cosméticos, susceptibles a la contaminación se establecen los límites microbianos que se indican en la Tabla 1.

Tabla 1— Requisitos para la Materias Primas

Tipo	Límites
Origen animal, vegetal y mineral	100 UFC de microorganismos aerobios Mesófilos en 0,1 gramo o mililitro del producto No <u>Enterobacteriaceae</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto No <u>Pseudomonas aeruginosa</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto No <u>Staphylococcus aureus</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto No <u>Clostridium perfringens</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto No Hongos en 0,1 gramo o mililitro del producto

4.2 Productos terminados

Para los grupos de productos cosméticos se establecen los límites microbianos máximos que se indican en la Tabla 2.

Tabla 2—Requisitos para los Productos Terminados

Grupos	Límites
<p>I Productos para el embellecimiento de los ojos</p> <p>Sombras en barra y en polvo, delineadores, cremas para alrededor de los ojos, mascarógrafos para pestañas, lápices cosméticos y otros</p>	<p>100 UFC de microorganismos aerobios mesófilos en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Enterobacteriaceae</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Pseudomonas aeruginosa</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Staphylococcus aureus</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Clostridium perfringens</u> en 0,1 gramo del producto</p> <p>No Hongos en 0,1 gramo o mililitro del producto</p>
<p>II Productos para el cuidado y embellecimiento del cuerpo y el cabello</p> <p>Cremas líquidas y sólidas, perfumes en crema, aceites de belleza, aceites de tratamiento y de masaje, cremas nutritivas, cremas acondicionadoras, suavizadoras, neutralizadoras y para masajes, desodorantes, brillantinas sólidas, líquidas y en crema, geles para el cabello y para el baño, champúes, talcos, polvos faciales, aceites y cremas bronceadoras, espuma de afeitarse y otros</p>	<p>1000 UFC de microorganismos aerobios mesófilos en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Enterobacteriaceae</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Pseudomonas aeruginosa</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Staphylococcus aureus</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Clostridium perfringens</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No Hongos en 0,1 gramo o mililitro del producto</p>

Tabla 2 — Requisitos para los Productos Terminados (continuación)

Grupos	Límites
<p>III Productos para el cuidado bucal y el embellecimiento de los labios</p> <p>Cremas dentales, enjuagues bucales, gel dental, creyones para los labios, brillo labial, protectores labiales y otros</p>	<p>1000 UFC de microorganismos aerobios mesófilos en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Enterobacteriaceae</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Pseudomonas aeruginosa</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Staphylococcus aureus</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Salmonella sp</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No Hongos en 0,1 gramo o mililitro del producto</p>
<p>IV Productos infantiles</p> <p>Aceites, perfumes, cremas líquidas y sólidas, geles para el baño, cremas dentales, champúes, jabones infantiles y otros.</p>	<p>100 UFC de microorganismos aerobios mesófilos en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Enterobacteriaceae</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Pseudomonas aeruginosa</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Staphylococcus aureus</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Clostridium perfringens</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No <u>Salmonella sp</u> en 0,1 gramo o mililitro del producto</p> <p>No Hongos en 0,1 gramo o mililitro del producto</p>
<p>NOTA La determinación de <u>Salmonella</u> en el grupo IV solamente se le realiza a la crema dental</p>	

5 Muestreo

Teniendo en cuenta el riesgo microbiano del cosmético, las muestras se tomarán en el proceso de envasado por cada carga de producción, la cantidad mínima siguiente:

Producto de alto riesgo 4 muestras
Producto de bajo riesgo 2 muestras

En los casos que se detecten problemas en las producciones, se pueden tomar otras cantidades de muestras, para lo cual se aplicará la NC-ISO 2859-2: 2003.

6 Métodos de ensayo

6.1 Principio

Consiste en la siembra de las muestras de productos cosméticos en medios de cultivo no selectivo, para el conteo total de microorganismos aerobios mesófilos viables y en medios selectivos, para la identificación de aquellas especies de microorganismos aerobios o anaerobios viables indeseables.

6.2 Reactivos y materiales

Se empleará en la preparación de los medios de cultivo y de las soluciones reactivo, agua para uso en análisis de laboratorio según la NC/ISO 3696 y productos químicos analíticos de calidad p. a.

6.2.1 Medios de cultivo

Para el conteo total de colonias de bacterias aerobias mesófilas se empleará el medio de Agar para Conteo en Placa o Agar de Tryptona Soya y para el conteo total de hongos filamentosos se empleará el medio de Agar Sabouraud Dextrosa con cloranfenicol para inhibir los aerobios mesófilos. En la comprobación de microorganismos anaerobios se empleará Agar reforzado para Clostridio y en la identificación de las especies de microorganismos se utilizan medios de cultivo selectivos.

6.2.2 Soluciones

Para las soluciones y soluciones indicadoras ver el anexo A (normativo)

6.3 Aparatos

6.3.1 Placas de Petri estériles de (100 X 10) mm y (100 x 15) mm.

6.3.2 Tubos de cultivo de (100 x 13) mm y (150 x 20) mm.

6.3.4 Pipetas graduadas estériles de (1,2,5 y 10) mL.

6.3.5 Frascos de boca ancha con tapa de rosca de (100 x 50) mm.

6.3.6 Frascos cónicos de 300 mL.

6.3.7 Incubadoras de (20 a 60) °C.

6.3.8 Horno de temperatura regulable de 100 °C a 180 °C.

6.3.9 Autoclaves.**6.3.10 Baños de agua regulables.****6.3.11 Balanza analítica VD 0,1 mg.****6.3.12 Balanza técnica VD 0,1 g.****6.3.13 Microscopio óptico.****6.3.14 Estereoscopio óptico.****6.3.15 Contador de colonias.****6.3.16 Asas de cultivo.****6.3.17 Medidor de pH.****6.3.18 Porta objetos.****6.3.19 Cubre objetos****6.4 Requisitos del área de trabajo**

El área de trabajo destinada a las determinaciones del límite microbiano deberá cumplir las condiciones de asepsia, examinándose en cada jornada, para lo cual se emplean placas con cada uno de los medios de cultivos utilizados, las que se dejan expuestas al aire ambiente. Los ensayos no pueden realizarse en áreas que estén bajo los efectos de agentes antimicrobianos, ya sean de origen químicos, físicos o ambos.

6.5 Preparación de la muestra de ensayo**6.5.1 Tratamiento previo a las muestras**

Se empleará una solución de alcohol etílico al 70 % v/v para limpiar la superficie de los envases, esperando a que se seque totalmente para iniciar las determinaciones.

De los envases individuales, se pesa o se mide en condiciones de asepsia 10 g o mL de producto y se transfieren a un frasco que contiene solución salina fisiológica 0,85 % y solución 20 % de polisorbato 80 (Tween 80) estéril, previamente calentado a 45 ° C en un baño de agua, según tabla 3. Se agita suavemente para lograr la homogeneización de la porción de ensayo.

6.5.2. Preparación del líquido de dilución

En dependencia del tipo de producto se tendrán que utilizar diferentes combinaciones del líquido de dilución (solución salina al 0,85 %) con una solución al 20 % de polisorbato 80 (Tween 80). Las adiciones de cada componente para alcanzar una dilución 1:10, se establece en la tabla 3.

Tabla 3 — Líquido de dilución

Tipos de cosméticos	Líquido de dilución	Dilución 1: 10 mL
Crema líquidas, crema desrizadoras, crema neutralizadoras, espumas de afeitar, crema dentales, talcos y otros.	Solución salina Solución Tween 80	88,2 1,8
Crema de aceite en agua	Solución salina Solución Tween 80	80,0 10,0
Crema muy grasas de agua en aceite	Solución salina Solución Tween 80	67,5 22,5
NOTA Todos los ensayos establecidos en la norma tendrán que realizarse por duplicado.		

6 Procedimiento

6.6.1 Conteo total de microorganismos aerobios

Se utiliza el método de placa vertida. En cada una de las placas estériles se deposita 1 mL de la porción de ensayo (ver 6.5.1), tomada en forma aséptica. Se vierten en cada placa de 15 a 20 mL de medio de cultivo de Agar para Conteo en Placa o Agar de Tryptona Soya, previamente fundido en un baño de agua y enfriado a 45° C.

Se procede de inmediato a rotar las placas suavemente para facilitar que se mezcle homogéneamente la porción de ensayo con el medio, evitando salpicar los bordes ni la tapa de la placa. Las placas se colocan sobre una superficie plana hasta que se solidifique su contenido. Para cada sesión de trabajo en el cuarto de siembra se utilizan placas para el control del medio de cultivo y para el control del líquido de dilución. Una vez solidificadas las placas se invierten y se incuban a la temperatura de 35°C a 37°C durante 48 horas.

6.6.2 Conteo de colonias

Transcurrido el tiempo de incubación se cuentan las colonias que aparecen en cada placa utilizando un contador de colonia. Se toman las placas donde hayan más de 30 y menos de 300 colonias.

6.6.3 Expresión de los resultados

El conteo total se determina mediante la suma del número de colonias contadas en las dos placas dividido por dos y multiplicado por el factor de dilución.

Se expresa en unidades formadoras de colonias por gramo o mL, de la porción de ensayo

6.7 Conteo total de hongos

Ver 6.6.1.

El medio de cultivo utilizado es Agar Saboureaud Dextrosa. Una vez solidificados los contenidos de las placas se invierten y se ponen a incubar a la temperatura de 25 ° C a 30 ° C durante 7 días.

6.7.1 Conteo de colonias

Se efectuarán los conteos al quinto y séptimo día de incubación y se procederá según 6.6.2

6.7.2 Expresión de los resultados

Ver 6.6.3.

6.8 Enterobacteriaceae

Ver 6.6.1

El medio de cultivo utilizado es Agar de MacConkey No. 3 modificado (con adición de glucosa). Una vez solidificados los contenidos de las placas, se invierten y se ponen a incubar a la temperatura de 35° C a 37° C durante 18 h a 24 h.

En ese momento deben aparecer los microorganismos fermentativos de la glucosa o de la lactosa o ambos con colonias de color rojo violeta. Las colonias sospechosas se someten a las pruebas de oxifermentación y de la oxidasa. Para esta determinación se siembran 2 colonias típicas en Agar Nutriente y se incuban a una temperatura de 35° C a 37 °C, durante 24 h. Pasado este período de tiempo, del crecimiento obtenido se siembran 2 tubos por picadura con Agar glucosa. Uno de ellos se pone a incubar en condiciones de anaerobiosis y el otro en condiciones de aerobiosis durante 24 h a una temperatura de 35° C a 37° C.

Una reacción de color amarillo en el medio es índice de una fermentación. A su vez se realiza la prueba de la oxidasa que debe ser negativa para esta familia.

6.8.1 Salmonella

En forma aséptica se toman 10 mL de la porción de ensayo y se procede según 6.5.1 y se depositan en un frasco de cultivo que contiene 90 mL de Caldo Tetrionato, como medio de enriquecimiento, se incuba a 37° C durante 24 h . Pasado ese tiempo, con un asa de cultivo se efectúan estrías de la solución anterior en una placa con Agar Salmonella-Shigella (Agar SS Modificado). Se incuba a 37 °C durante 48 h . Pasado este tiempo se examina la placa. Los microorganismos lactosa-negativos originan colonias planas, incoloras y transparentes. Si crece algún microorganismo fermentativo de la lactosa, éste desarrollará una colonia roja o rosada. Debe corroborarse el diagnóstico mediante pruebas bioquímicas para Salmonella.

Otro método consiste en emplear agar verde brillante directo con la muestra. La preparación del líquido de dilución según 6.5.2

6.9 Pseudomonas aeruginosa

En forma aséptica se toman 10 mL de la porción de ensayo, procediéndose según 6.5.1 y se depositan en un frasco de cultivo que contenga 90 mL de Infusión de Cerebro y Corazón como

medio de enriquecimiento. Se incuba a 37 °C durante 24 h. Pasado este tiempo, con un asa de cultivo se efectúan estrías de la solución anterior en una placa de Agar de Cetrimida.

Se incuba a 37 °C durante 48 h. Terminado este período de incubación se examina la placa. De aparecer colonias con una coloración verde azulosa y con un olor característico, éstas se someten a la prueba de la oxidasa. La reacción positiva a la misma, es un índice presuntivo de Pseudomonas aeruginosa.

6.10 Staphylococcus áureos

Para el enriquecimiento de la porción de ensayo se procede según 6.9. Finalizado el período de incubación, con un asa de cultivo se efectúan estrías de la solución de enriquecimiento en Placas de Agar Manitol Salado o Medio de Baird Parker o ambos; las placas de Agar Manitol Salado y Medio de Baird Parker, se ponen a incubar durante 24 h a 48 h, a una temperatura de 35 °C a 37 °C.

En las placas de Agar Manitol Salado, la aparición de colonias con zonas de coloración amarillo brillante es una prueba presuntiva de Staphylococcus aureus. Si las colonias aparecen rodeadas de una zona de color rojo o púrpura, puede tratarse de Staphylococcus coagulasa negativo. En las placas de Medio de Baird Parker, la aparición de colonias negras, brillosas convexas, con un margen estrecho de color blanco y rodeada de una zona clareada de 2 mm a 5 mm, es una prueba presuntiva de Staphylococcus aureus. Debe corroborarse el diagnóstico haciendo la prueba de la coagulasa a partir de las colonias sospechosas.

6.10.1 Prueba de coagulasa

El microorganismo se siembra en un medio de infusión de Cerebro y Corazón. A las 24 h de Incubación a 37° C, se transfiere 0,5 mL a un tubo estéril que contenga 1 mL de una solución preparada con 9 mL de solución salina fisiológica 0,9 % y 3 mL de plasma humano fresco y sin preservo. Se realiza un ensayo de control con una cepa tipo coagulasa positiva.

Los tubos se incuban durante 3 h a 37° C, al cabo de las cuales se realiza la lectura. Si hay formación de coágulos la prueba es positiva, si no hay formación de coágulos los tubos se dejan en la incubadora por 24 h más, por si hay microorganismos productores de coagulasa tardía.

6.11 Clostridium perfringens

Ver 6.6.1.

El medio de cultivo para esta determinación es Agar Reforzado para Clostridio. Una vez solidificado se vierten 10 mL más del mismo medio y se deja solidificar, después se ponen a incubar a 37° C, durante 48 h en condiciones de anaerobiosis. Pasado este tiempo la aparición de colonias claras productoras de abundante gas, capaces de romper el medio de Agar, es una prueba presuntiva de la presencia de Clostridium perfringens.

Se le hace la prueba de la catalasa y si da negativa se toma una colonia y se pasa a un medio de Agar para Conteo en Placa o de Agar de Tryptona Soya, poniéndose a incubar en aerobiosis durante 48 h, a una temperatura de 37 °C, para descartar la posibilidad de un anaerobio facultativo.

Otro Método consiste en emplear como medio de cultivo leche púrpura de Crosley.

7 Informe del ensayo

El resultado de la determinación se inscribe en el registro del laboratorio, incluyendo la siguiente información:

- Identificación de la muestra
- Fecha de fabricación y envasado del producto
- Fecha de realización del ensayo
- Resultado de la determinación
- Nombre del analista

Anexo A
(normativo)**Soluciones y soluciones indicadoras****A.1 Solución salina fisiológica 0,85 % ó 0,90 %**

Cloruro de sodio	0,85 g ó 0,90 g
Agua	100,0 mL

Los componentes se mezclan bien, se esterilizan en el autoclave con una temperatura de 121°C y a una presión de 102,96 kPa (1,05 kgf/cm²), durante 15 minutos

A.2 Reactivo de Kovac

Alcohol isoamílico o amílico	150,0 mL
Paradimetilaminobenzaldehido	10,0 g
Ácido clorhídrico	50,0 mL

Se disuelve el aldehído en el alcohol y se añade lentamente el ácido clorhídrico. Se conserva la Solución en un frasco ámbar.

A.3 Bromocresol púrpura 0,04 %

Solución de hidróxido de sodio 0,01 mol/L	18,5 mL
Bromocresol púrpura	0,1 g
Agua	250,0 mL

Los componentes se mezclan bien y se conservan en un frasco bien tapado

A.4 Rojo neutro 0,1 %

Rojo neutro	0,1 g
Alcohol etílico	100,0 mL
Se procede según A.3.	

A.5 Cristal violeta 0,1 %

Cristal violeta	0,1 g
Agua	100,0 mL
Se procede según A.3 .	

A.6 Dihidrocloreto de tetrametilparafenilendiamina

N,N.N', N' tetrametilparafenilendiamina	1,0 g
Agua	100,0 mL

Los componentes se mezclan bien, si es necesario se puede calentar para ese propósito. El reactivo se debe conservar bien protegido de la luz y en refrigeración, durante 2 semanas. Se debe desechar si toma una coloración púrpura oscuro.

A.7 Solución azul de bromotimol 0,2 %

Azul de Bromotimol	0,1 g
Solución de hidróxido de sodio 0,1 N	2,5 mL
Agua	47,5 mL

Los componentes se mezclan bien y se conservan en un frasco bien tapado.

Anexo B
(normativo)

Medios de cultivo

B.1 Agar para conteo en placa

Tryptona	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Dextrosa	1,0 g
Agar No. 1	9,0 g
Agua	1 000,0 mL

Los componentes se disuelven en agua por calentamiento hasta ebullición y se ajusta el pH. Se esteriliza en el autoclave con una temperatura de 121° C y a una presión de 102,96 kPa (1,05 kgf/cm²), durante 15 min. El pH después de la esterilización será de 7,0 ± 0,2.

B.2 Agar de Tryptona Soya

Tryptona	15,0 g
Peptona de Soya	5,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar No. 1	15,0 g

Se procede según B.1. El pH después de la esterilización será de 7,3 ± 0,2.

B.3 Agar de MacConkey No. 3 (modificado)

Peptona	20,0 g
Lactosa	10,0 g
Glucosa	10,0 g
Sales biliares No. 3	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar No. 1	15,0 g
Agua	1 000,0 mL

Se procede según B.1. El pH después de la esterilización será de 7,1 ± 0,2.

B.4 Agar de Sabouraud Dextrosa

Peptona micológica	10,0 g
Dextrosa	40,0 g
Agar No. 1	15,0 g
Agua	1 000,0 mL

Se procede según B.1 el pH después de la esterilización será de 5,6 ± 0,2.

B.5 Infusión de Cerebro y Corazón

Infusión de cerebro de ternera	12,5 g
Infusión de corazón de buey	5,0 g
Proteosa peptona	10,0 g
Dextrosa	2,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Dihidrógeno fosfato de sodio	2,5 g
Agua	1 000,0 mL

Se procede según B.1. El pH después de la esterilización será de $7,4 \pm 0,2$.

B.6 Agar Manitol Salado

Extracto de carne	1,0 g
Peptona	10,0 g
Manitol	10,0 g
Cloruro de sodio	75,0 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agar No. 1	15,0 g
Agua	1 000,0 mL

Se procede según B.1. El pH después de la esterilización será $7,5 \pm 0,2$.

B.7 Agar de Cetrímida

A) Medio Basal	
Proteosa peptona	20,0 g
Glicerina	10,0 g
Agar No.1	15,0 g
Agua	1 000,0 mL

Los componentes se disuelven en el agua por calentamiento hasta la ebullición. Se distribuyen porciones de 100,0 mL en frascos cónicos con tapón de algodón. Se ajusta el pH, se esteriliza en el autoclave con una temperatura de 121°C y una presión de 102,96 kPa ($1,05\text{ kgf/cm}^2$) durante 15 min. El pH después de la esterilización será de $7,2 \pm 0,1$.

.B) Soluciones	
Dihidrógeno fosfato de potasio (solución al 15%)	1,0 mL
Sulfato de magnesio (solución al 15%)	1,0 mL
Cetrimida (solución al 2% de bromuro de cetil-trimetil-amonio)	1,5 mL

Estas soluciones se preparan con agua y se esterilizan a través de un filtro Seitz.

Estas soluciones B) se añadirán a las porciones de 100 mL de medio basal A) previamente fundido en baño de agua y enfriado a 45 ° C en el momento de la siembra.

B.8 Agar reforzado para Clostridio

Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne	10,0 g
Peptona	5,0 g
Dextrosa	5,0 g
Almidón soluble	1,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Acetato de sodio	3,0 g
Hidrocloruro de cistina	0,5 g
Agar No. 1	15,0 g
Agua	1 000,0 mL

Se procede según B.1. El pH después de la esterilización será de $6,8 \pm 0,2$.

B.9 Agar de Hierro-Triple Azúcar

Extracto de carne	3,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Peptona	20,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Dextrosa	10,0 g
Citrato férrico	1,0 g
Sulfato de sodio	0,3 g
Rojo fenol	0,3 g
Agar No. 1	12,0 g
Agua	1 000,0 mL

Se procede según B.1. El pH después de la esterilización será de $7,4 \pm 0,2$.

B.10 Caldo Urea

A) Medio Basal	
Peptona	1,0 g
Dextrosa	1,0 g
Dihidrógeno fosfato de sodio	1,2 g
Hidrógeno fosfato de dipotasio	0,8 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Rojo fenol	0,004 g
Agua	950,0 mL

Los componentes se disuelven en agua. Se ajusta el pH. Se distribuyen porciones de 95,0 mL en frascos cónicos con tapón de algodón. Se esterilizan en la autoclave con una temperatura de 115 °C y una presión de 49,05 kPa (0,5 kgf/cm²), durante 20 min. El pH después de la esterilización será de 6,8 ± 0,2.

B) Solución

Solución de Urea al 40% (estéril)	5,0 mL
--------------------------------------	--------

Una vez esterilizado el medio basal A se enfría hasta 55 ° C y se le añaden asépticamente 5 mL de la solución B. Se mezcla bien y se depositan cantidades de 10 mL en tubos de cultivo estéril.

B.11 Agar Salmonella Shigella (Agar SS modificado)

Extracto de carne	5,0 g
Peptona	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares	5,0 g
Citrato de sodio	10,0 g
Tiosulfato de sodio	8,5 g
Citrato férrico	1,0 g
Verde brillante	0,00033 g
Rojo neutro	0,025 g
Agar No. 1	15,0 g
Agua	1000,0 mL

Los componentes se disuelven en el agua por calentamiento hasta ebullición. Se ajusta el pH a 7,0 ± 0,2. No se esteriliza en el autoclave. Se enfría hasta 55 °C y se vierten porciones de 20 mL en placas estériles.

B.12 Medio de Baird Parker

Tristona	10,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Extracto de levadura	10,0 g
Piruvato de sodio	10,0 g
Glicina	12,0 g
Cloruro de litio	5,0 g
Agar	20,0 g
Agua	1 000,0 mL

Los componentes se disuelven en el agua por calentamiento hasta ebullición. Se distribuyen porciones de 100 mL en frascos cónicos. Se ajusta el pH. Se esteriliza en autoclave con una temperatura de 121 ° C y una presión de 102,96 kPa (1,05 kgf/cm²), durante 15 min. El pH después de la esterilización será de 6,8 ± 0,2. Se enfría a 50 °C y asépticamente se le añaden 5 mL de Emulsión de yema de huevo - Telurito a cada frasco. Se agita suavemente hasta que quede bien mezclado. Se vierten 15 mL en placas de Petri estériles y se dejan sobre una superficie plana hasta que se solidifiquen. Las placas se pueden guardar a 4 °C durante un máximo de 7 a 10 días. Una vez mezclado el medio con la Emulsión de yema de huevo – Telurito no debe

recalentarse para licuarlo por lo que debe prepararse la cantidad de placas de Petri necesarias para usar en el máximo de tiempo señalado.

B.13 Agar Citrato de Simmons

Sulfato de magnesio	0,2 g
Fosfato ácido de amonio	0,2 g
Fosfato de sodio y amonio	0,8 g
Citrato tribásico de sodio	2,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Bromotimol azul	0,08 g
Agar	10,0 g
Agua	1 000,0 mL

Se procede según B.1. El pH después de la esterilización será de $7,0 \pm 0,2$.

B.14 Agar Azufre Indol-motilidad

Extracto de carne	3,0 g
Peptona	30,0 g
Sulfato ferroso	0,2 g
Tiosulfato de sodio	0,025 g
Agar	3,0 g
Agua	1 000,0 mL

Los componentes se disuelven en el agua por ebullición. Se distribuye el medio en tubos de cultivo hasta una altura de 6 cm. Se ajusta el pH, se esteriliza en el autoclave a una temperatura de 121 °C y a una presión de 102,96 kPa (1,05 kgf/cm²) durante 15 minutos.

El pH después de la esterilización será de $7,3 \pm 0,2$.

B.15 Agar de fenilalanina

Extracto de levadura	3,0 g
d-fenilalanina	2,0 g
Dihidrógeno fosfato de potasio	1,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	10,0 g
Agua	1 000,0 mL

Se procede según B.1. El pH después de la esterilización será de $7,3 \pm 0,2$.

B.16 Base para carbohidratos

Extracto de carne	1,0 g
Proteosa peptona	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Bromocresol púrpura	0,015 g
Carbohidrato	10,0 g
Agua	1 000,0 mL

Carbohidratos a emplear;

Glucosa	Salicina
Manitol	Trihalasa
Ramnosa	Sorbitol
Maltosa	Rafinosa
Lactosa	Galactosa
Dulcitol	Arabinosa
Adonitol	Inositol
Sacarosa	Xilosa

Los componentes se disuelven en el agua. Se vierten 10 mL en tubos de cultivo. Se ajusta el pH y se esteriliza en la autoclave con una temperatura de 121 ° C y una presión de 102,96 kPa (1,05 kgf/cm²) durante 15 min. Se exceptúa la Arabinosa y la Xilosa que tienen que ser esterilizadas en un filtro Seitz. El pH después de la esterilización es de 6,8 ± 0,2.

B.17 Caldo Tetrionato

A) Medio basal	
Proteosa peptona	5,0 g
Sales biliares	1,0 g
Carbonato de calcio	10,0 g
Tiosulfato de sodio	30,0 g
Agua	1 000,0 mL
B) Solución yodoyodurada	
Yodo cristalizado	6,0 g
Yoduro de potasio	5,0 g
Agua	20,0 mL

Los componentes del Medio Basal (A) se disuelven en el agua calentada hasta ebullición. Se distribuyen cantidades de 100 mL en frascos cónicos. Se ajusta el pH. Se esteriliza en la autoclave a una temperatura de 121 ° C y a una presión de 102,96 kPa, (1,05kgf/cm²) durante 30 min. El pH después de la esterilización será de 7,0. Después de esterilizado se enfría a 45 ° C y se le añaden 2 mL de la solución (B) a cada frasco.

Se agita bien para homogeneizar la mezcla. Si no se usan todos los frascos con medio basal, se pueden guardar en refrigeración sin la solución (B); ésta se añadirá en el momento de usar el medio

B.18 Agar Glucosa

Triptona	2,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Glucosa	0,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Hidrógeno fosfato de dipotasio	0,3 g
Azul de bromotimol (solución al 0,2 %)	40,0 mL
Agar	3,0 g
Agua	960,0 mL

Se procede según B.1. Se distribuyen cantidades de 10 mL en tubos de cultivo, antes de la esterilización. El pH después de la esterilización será de $7,1 \pm 0,2$.

B.19 Agar Nutriente

Extracto de carne	1,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
Peptona bacteriológica	5,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua	1 000,0 mL

Se procede según B.1. El pH después de la esterilización será de $7,4 \pm 0,2$.

B-20 Agar Verde Brillante

Proteosa Peptona	10,0 g
Extracto de Levadura	3,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Rojo fenol	0,08 g
Verde brillante	0,0125
Agar	12,0 g

Añadir 50 g a un litro de agua destilada. Llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 121°C 15 minutos. Enfriar a 50°C antes de verter las placas Petri.

B-21 Leche púrpura de Crossley

Leche descremada	100,0 g
Peptona	10,0 g
Púrpura de Bromocresol	0,1 g

Los componentes se disuelven en agua, se distribuyen en tubos con tapas de rosca a razón de 10 mL por tubo. Se ajusta el pH. Se esteriliza en autoclave a una temperatura de 121°C y a una presión de 102.96 kPa ($1,05 \text{ kgf/cm}^2$) durante 5 minutos. Si se desea el medio mas anaeróbico añadir 0,5 g/l de cisteína

Bibliografía

- [1] ISO 6579:19993 Microbiología. Guía General de los métodos para la detección de Salmonella.
- [2] ISO 7402: Microbiología. Guía general para la enumeración de Enterobacteriaceae sin revivificación Técnicas de MPN y técnicas de conteo de colonias.
- [3] ISO 7937:1985 Microbiología. Guía general para la enumeración de Clostridium perfringens. Técnicas para el conteo de colonias.
- [4] ISO 7954:1987 Microbiología. Guía general para la enumeración de levaduras y hongos. Técnicas para el conteo de colonias a 25 ° C.
- [5] ISO 10718:19893 Tapones de corcho. Enumeración de unidades de colonias de levaduras, hongos y bacterias capaces de crecer en un medio alcohólico
- [6] ISO 4833:1991 Microbiología. Guía general para la enumeración de microorganismos. Técnicas para el contenido de colonias a 30 ° C.
- [7] ICONTEC 1273:1975 Miel de abejas.
- [8] ICONTEC 1689:1982 Industria farmacéutica y cosmética. Champú.
- [9] IS 8512:1977 Especificación para la miel de abejas Carbia Callosa.
- [10] IS 9875:1990 Creyones labiales. Especificaciones.
- [11] NOM - F- 36 - A:1981 Miel de abeja. Especificaciones.
- [12] NC 26 -121:1993 Medicamentos. Medicamentos no estériles. Determinaciones microbiológicas.
- [13] NC 26 -121 -1:1993 Medicamentos. Características microbiológicas.
- [14] NC 74 – 45:1987 Apicultura. Miel de abeja. Especificaciones.
- [15] BAM - FDA. Octava edición. Año 1995
- [16] DALOWS, A. y HAUSLER. W. J. Procedimiento para el Diagnóstico de las inspecciones Bacterianas, Micóticas y Paracitarias. ESTADOS UNIDOS DE AMERICA 1981.
- [17] Farmacopea de los ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMERICA. Tercera edición. Año 1997
- [18] PIATKIN, K.D. Y KRIVOSHEIN. Y. S. Microbiología. Editorial Mir. MOSCU. Edición del año 1981.
- [19] PROCALAN N, S.A. Análisis microbiológico. Normas metódicas. ESPAÑA.
- [20] Revista Americana de Perfumería y Cosméticos. 86 (2) febrero. Edición 1971

[21] SALLE, A. J. Bacteriología. I.C.L. LA HABANA 1986

[22] Suplemento de la Farmacopea Europea 1999

[23] ZINSER. Microbiología. Editora Revolucionaria. LA

[24] Buenas Prácticas de Producción de Productos Cosméticos. Ministerio de Sanidad y consumo Madrid 2002

[25] Manual para el control Microbiológico de productos cosméticos. Comité Asesor de Cosmetología Ministerio de Sanidad y consumo España Año 1994