



# **UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**

Determinación de la calidad microbiológica en productos cosméticos  
comercializados en el mercado de Salamanca de Monterrico – Ate

## **TESIS**

Para optar el título profesional de Licenciada en Biología

## **AUTORA**

Hernando Garcia, Nadia Valentina

0009-0004-4052-7605

## **ASESOR**

Lic. Guerra Santa Cruz, Alcides

0000-0002-5130-8190

Lima, Perú

2023

## **Metadatos complementarios**

### **Datos del autor(a)**

Hernando Garcia, Nadia Valentina Fiorella

**Tipo de documento de identidad:** DNI

**Numero de documento de identidad:** 70430672

### **Datos del(a) asesor(a)**

Guerra Santa Cruz, Alcides

**Tipo de documento de identidad:** DNI

**Numero de documento de identidad:**

### **Datos de los Miembros del Jurado**

**Presidente:** Agurto Saenz, Tomás Rene

**DNI:** 07207844

**ORCID:** 0000-0001-5186-9565

**Secretario:** Dávila Robles, Miguel Germán

**DNI:** 07261702

**ORCID:** 0000-0002-7429-4836

**Vocal:** Fernández Tuesta, Daniel

**DNI:** 09839931

**ORCID:** 0000-0001-6653-0109

### **Datos de la investigación**

Campo del conocimiento OCDE: 1.06.01

Código del Programa: 511206

## **DEDICATORIA**

Dedico este estudio a mis padres,

Raúl y Mercedes, por ser siempre mi motivación

para crecer como profesional.

A mi hermana Iulia por su incondicional apoyo.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi asesor Alcides Guerra, por su compromiso y ayuda en el transcurso de esta investigación.

A Life Beauty Corporation y al Ing. Castilla por la confianza y el soporte durante estos 6 años de trabajo en equipo.

## RESUMEN

Actualmente, los límites de riesgo para la salud de los diferentes productos cosméticos comercializados son cada vez más cortos, por lo que el control microbiológico de estos productos es fundamental para respaldar la seguridad de los usuarios y la calidad del producto y conservar una buena imagen de empresas manufactureras o comercializadoras en el mercado.

En el actual estudio se realizó la determinación de la calidad microbiológica de 50 muestras de lápices labiales que se comercializan en los mercados de Salamanca de Monterrico – Ate.

Los análisis se han realizado de acuerdo con lo que indica la USP 43 y las Normas técnicas peruanas para cosméticos.

Como resultados se obtuvo que: se detectó un aumento de hasta 120 ufc/g en el número total de microorganismos aerobios mesófilos, ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*, presencia de *Staphylococcus aureus* en dos muestras y ausencia de *Escherichia col*, en el cálculo total de levaduras y mohos todas las muestras presentaron recuento llegando a obtener recuentos de MNPC (Muy numeroso para contar).

El 100 % de las muestras se encontraron dentro de especificación del análisis del número total de microorganismos aerobios mesófilos totales, sin embargo, el 4 % presentó presencia de patógenos y el 36% presentó recuento fuera de especificación de mohos y levaduras.

En conclusión, los lápices labiales comercializados en los mercados de Salamanca de Monterrico – Ate no cumplen con la calidad microbiológica arriesgando la salud de los usuarios finales.

**Palabras Clave:** Cosméticos, lápiz labial, calidad, contaminación microbiológica, mohos y levaduras.

## ABSTRACT

Currently, the focus on the health risk of the different cosmetic products marketed is becoming more and more narrow, aimed at which the microbiological control of these becomes vital to pledge the safety of the operator then the excellence of the product, being of vital importance to maintain a good image on the part of the production or marketing company in the market.

In the current examination, the determination of the bacteriological quality of 50 tasters of lipsticks that are commercialized in the markets of Salamanca de Monterrico - Ate was carried out.

The analyzes consume remained approved available trendy agreement by pardon is indicated by USP 43 and the Peruvian technical standards for cosmetics.

By way of outcomes, the situation remained gotten that: high the count of total mesophilic aerobic microorganisms' growth was evidenced up to 120 cfu/g, absence of *Pseudomonas aeruginosa*, presence of *Staphylococcus aureus* in two samples and absence of *Escherichia coli*, in the total count of molds and yeasts, all the samples presented a count reaching up to MNPC.

100% of the illustrations stood originate toward remain within specification for the count analysis of total viable mesophilic microorganisms, however, 4% presented the presence of pathogens and 36% presented a count outside the specification of molds and yeasts.

In conclusion, the lipsticks sold in the markets of Salamanca de Monterrico - Ate do not meet the required microbiological quality, putting the health of end users at risk.

**Keywords:** Cosmetics, lipstick, quality, microbiological contamination, molds and yeasts.

# ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
ÍNDICE	6
I. INTRODUCCIÓN	9
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
III JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	11
IV OBJETIVOS	12
4.1 OBJETIVO GENERAL	12
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
V MARCO TEÓRICO	13
5.1 Los Labios	13
5.2 Anatomía de los Labios	13
5.3 Definición de cosmético	14
5.4 Clasificación de los productos cosméticos:	15
5.5 Definición de lápices labiales:	19
5.6 Historia de los labiales	20
5.7 Importancia de los conservantes	21
5.8 Parámetros de calidad microbiológica en labiales	23
5.9 Límites microbiológicos de los lápices labiales	23
5.10 Microorganismos patógenos de importancia en la industria cosmética	24
5.10.1 <i>Escherichia coli</i>	24
5.10.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	25
5.10.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
5.11 Importancia clínica de la contaminación microbiana	25
5.12 Factores determinantes de la contaminación del producto	29
VI ANTECEDENTES	34
VII HIPÓTESIS	35
VIII MATERIALES Y MÉTODOS	36
8.1 Lugar de ejecución:	36
8.3 Preparación de los Medios de Cultivo:	36
8.4 Preparación de la muestra para análisis Microbiológico:	36

8.5 Recuento de microorganismos Aerobios Mesófilos Totales según NTP ISO 21149.2014 y Recuento Total de Mohos y Levaduras según USP 43	37
8.6 Detección de Patógenos	37
8.7 Investigación de <i>Escherichia coli</i> según NTP ISO 21150.2017:	37
8.8 Investigación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> según NTP ISO 21117.2017:	38
8.9 Investigación de <i>Staphylococcus aureus</i> según NTP ISO 21118.2017:	38
IX RESULTADOS	39
9.1 Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos Aerobios	39
9.2 Determinación de <i>Escherichia coli</i>	41
9.3 Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i>	41
9.4 Determinación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
9.5 Recuento Total de Mohos y Levaduras	43
X DISCUSION	48
XI CONCLUSIONES	50
XII RECOMENDACIONES	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Conservantes permitidos en EEUU, Comunidad europea y Japón	23
Tabla 2: Especificaciones de Límites microbianos para cosméticos según Resolución N° 1418 de la CAN	24
Tabla 3: Especificaciones de Límites microbianos para cosméticos según Resolución N°231-2008 de COMIECO	25
Tabla 4: Requerimiento de aw de microorganismos	31
Tabla 5: Productos con recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos Viables	41
Tabla 6: Muestras con recuento < 10 UFC/g de Microorganismos aerobios Mesófilos viables	41
Tabla 7: Lista de productos con Presencia de Staphylococcus aureus	43
Tabla 8: Muestras con Recuento de Mohos y Levaduras	45

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Unidad Labio Superior	14
Figura 2: Elementos de las unidades labio superior e inferior	14
Figura 3: Crecimiento de microorganismos aerobios	41
Figura 4: Colonias típicas de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar Manitol salado	42
Figura 5: Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en Baird Parker	42
Figura 6: Prueba de Coagulasa Positiva	42
Figura 7: Porcentaje del tipo de contaminación hallada	45
Figura 8: Porcentaje de muestras con resultado fuera de especificación para recuento total de Mohos y levaduras	45
Figura 9: Porcentaje de muestras dentro y fuera de especificación según la CAN	46
Figura 10: Porcentaje de Muestras dentro y fuera de especificación según la COMIECO	47

## I. INTRODUCCIÓN

El mundo de la cosmética, desde hace muchos años, se esfuerza por mejorar la estética y la apariencia del usuario final, creando, con este objetivo, productos innovadores con fórmulas diferentes que satisfagan las necesidades de sus clientes.

Los labios son una de las partes más expresivas de nuestro rostro. Se diferencian significativamente del resto de la piel y, a menudo, están expuestos a las condiciones ambientales.

Los labios tienen un contenido reducido de melanina, por lo que no se protegen del sol y se queman con facilidad. La manera más natural de hidratar tus labios es humedeciéndolos con saliva, por lo cual es importante que aquellos cosméticos que se usen en esta zona sean productos que garanticen su calidad microbiológica.

La seguridad de los cosméticos puede ser garantizada por la composición de materias primas de alta calidad, control del proceso de producción, pruebas de empaque, control de calidad e inspección de sus especificaciones técnicas previamente registradas ante la autoridad reguladora.

Un cosmético es considerado contaminado cuando contiene microorganismos patógenos u oportunistas; algunos de ellos pueden llegar a generar toxinas constituyendo un riesgo para la salud; también alteran el tiempo de vida útil del producto ya que pueden afectar sus características organolépticas y fisicoquímicas, que originan el deterioro del cosmético como tal.

En la resolución 1482 del 2002 de la CAN (Comunidad Andina de Naciones) se publicó los parámetros estandarizados para los valores límite microbiológicos que deben tener las formas cosméticas, con el objetivo de incluir medidas para informar al mercado sobre las actividades de control y vigilancia, así como la verificación de que el producto comercializado obedezca a las especificaciones técnicas de los informes sanitarios obligatorios.

## **II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Clasificados como cosméticos decorativos, los labiales se renuevan constantemente según las tendencias de la moda y las temporadas y son utilizados por todos los grupos sociales y desde la pubertad en adelante.

Los labiales conforman un accesorio de belleza indispensable y de uso cotidiano, especialmente de la población femenina, en Lima Metropolitana, por lo cual, estos productos resultan cada vez más accesibles a la población, económicamente hablando, despertando dudas sobre la calidad del producto.

Debido a la posible contaminación microbiana, los cosméticos contienen preservantes para evitar la proliferación de microorganismos durante su uso. Los conservantes son sustancias químicas que se agregan a los cosméticos con el fin de prevenir los riesgos de contaminación microbiana que podría alterar la salud de los consumidores (García, et al 2016). Sin embargo, en algunos productos que tienen pequeñas cantidades de agua rodeada de cera o silicona, los microorganismos pueden sobrevivir, pero no crecer.

## **III JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

Los controles microbiológicos de los cosméticos son fundamentales con el fin de certificar la calidad del producto y la seguridad del consumidor, así como para conservar una adecuada imagen de la entidad fabricante y/o comercializadora en el mercado.

Para producir y comercializar cosméticos se necesita un registro sanitario: NSO (Notificación sanitaria obligatoria), en el Perú, la Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID) es una entidad reguladora. Es un organismo técnico regulador encargado del control, la certificación y supervisión de los procedimientos vinculados con la fabricación, distribución, almacenamiento, importación, comercialización, promoción, promoción, dispensación y venta de productos farmacéuticos y afines, incluidos los cosméticos.

P&S Market Research (Empresa de análisis de mercado), explica que una de las causas por las que los labiales siguen siendo tan populares es su disponibilidad: como uno de los productos cosméticos más accesibles para todos los grupos sociales, también señala que el incremento del número de trabajadoras, la mejora de los estilos de vida y la actual tendencia

de compartir en las redes sociales. Las tendencias de imagen son un factor importante que impulsa el empleo, por lo que predice que la demanda del producto seguirá creciendo.

Según la Resolución N°1418 de la Comunidad Andina las especificaciones microbiológicas para los labiales son:

Recuento de microorganismos aerobios mesófilos:  $5 \times 10^3$  UFC/g o mL

*Pseudomonas aeruginosa*: Ausencia

*Staphylococcus aureus*: Ausencia

*Escherichia coli*: Ausencia

## IV OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la calidad microbiológica de los labiales comercializados en el mercado de Salamanca de Monterrico - Ate”.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar el ensayo microbiológico (NTP ISO 21149.2014) de Recuento de Bacterias Mesófilas totales.

Realizar el ensayo microbiológico (NTP ISO 21150.2017) para la detección de *Escherichia coli*.

Realizar el ensayo microbiológico (NTP ISO 21117.2017) para la detección de *Pseudomonas aeruginosa*.

Realizar el ensayo microbiológico (NTP ISO 21118.2017) para la detección de *Staphylococcus aureus*.

Realizar el ensayo microbiológico (USP 43) de Recuento Total de Mohos y Levaduras.

### 5.1 Los Labios

Los labios son dos músculos membranosos, uno arriba y otro abajo, que definen la apertura de la boca, colocados de manera horizontal en el tercio inferior de la cara, cubiertos de piel gruesa por delante y una fina capa rica en moco por detrás, glándulas mucosas y pequeñas glándulas salivales.

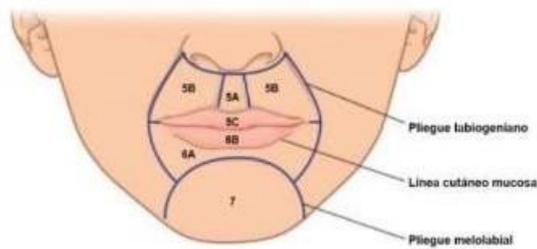
Los labios son estructuras que obedecen a funciones esenciales: defensa a las estructuras de la boca, siendo una entrada al organismo para obtener todos los alimentos, vocalización.

El suministro de sangre está relacionado fundamentalmente con las arterias faciales. La zona de transición entre la piel que recubre la superficie externa y la membrana mucosa de la superficie interna del labio es el área roja o borde bermellón, que forma el borde libre del labio y está recubierta por una piel modificada que recubre el borde. Constituidos por una capa de células muertas con un alto contenido en elidina, los labios son los responsables de su transparencia, lo que los distingue del resto de la capa córnea que conforma la piel (Laguna Gozme & Ricaldi Casas 2017).

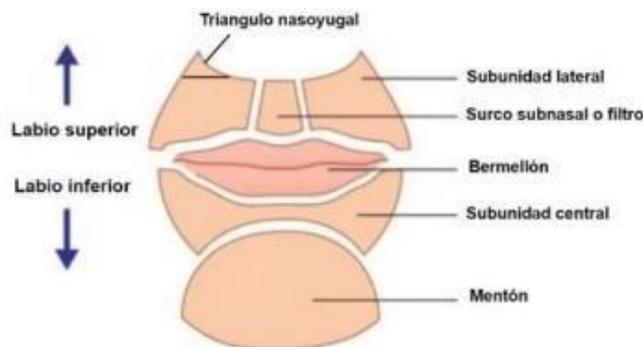
### 5.2 Anatomía de los Labios

Los labios son la abertura superior de la boca, y el labio superior está limitado por arriba por el surco alar y la columela, por los lados por los pliegues de los labios, y por abajo por el borde libre del bermellón. Consta de 4 subunidades: el filtro o surco, subnasal y laterales, mucosa o bermellón. En la parte central del bermellón, unos nódulos redondos llamados tubérculos se elevan en la parte superior del labio superior. La subunidad lateral también incluye el triángulo nasoyugal que rodea la base alar.

El labio inferior está delimitado por arriba por el borde superior del bermellón inferior, con los pliegues melolabiales hacia los lados y por abajo por el mentolabial. Tiene 2 subunidades: bermellón o mucosa. En el centro del bermellón hay una muesca central correspondiente al tubérculo del labio superior. Los labios superior e inferior se encuentran en la comisura y se separan para formar la cavidad bucal; cuando se acercan por primera vez, forman una hendidura en la mejilla (Calderón, 2015).



**Figura 1: Unidad Labio Superior**



**Figura 2: Elementos de las unidades labio superior e inferior**

### 5.3 Definición de cosmético

Los cosméticos son definidos por la Ley FD&C como “productos destinados a ser vertidos, frotados, rociados, aplicados o introducidos de otra manera al cuerpo humano o cualquier parte de este con el propósito de embellecer, limpiar, realzar el atractivo o alterar la apariencia.

En el artículo 1 de la Directiva en términos de cosmética, los cosméticos se describen como "cualquier preparado o sustancia destinada a entrar en contacto con distintas partes exógenas del cuerpo humano (genitales exógenos, labios, uñas, sistema capilar y epidermis) o con dientes y mucosas, cuyo fin único es mejorar la apariencia, perfumar y/o limpiar, además de prevenir el mal olor corporal y mantenerlas o protegerlas en buenas condiciones”. Cuando se utiliza en condiciones de empleo normales o razonablemente previsibles, el producto

descrito no debe representar un peligro para la salud humana y debe considerar la presentación, el etiquetado y las instrucciones del empleo de los productos.

La Ley de Asuntos Farmacéuticos de Japón define los cosméticos como artículos "Destinado a embellecer, limpiar, realzar el atractivo, cambiar la apariencia del cuerpo y conservar la piel y el cabello sanos mediante frotamiento, pulverización o aplicación similar en el cuerpo, siempre que la acción sea... suave " En 1996, el Ministerio de Salud y Bienestar de Japón consolidó los tipos de productos en las siguientes preparaciones: limpieza, cuidado del cabello, tratamiento, maquillaje, fragancias, bronceadores/protectores solares, maquillaje de uñas, delineador de ojos, labios, oral y preparaciones para el baño.

#### **5.4 Clasificación de los productos cosméticos:**

Los productos cosméticos y de cuidado personal se clasifican de la siguiente manera según DIGEMID:

#### **CLASIFICACIÓN DE PRODUCTOS COSMÉTICOS Y PRODUCTOS DE HIGIENE PERSONAL**

##### **A.- PRODUCTOS COSMÉTICOS PARA BEBES-NIÑOS**

- 1.- Champús
- 2.- Reacondicionador
- 3.- Loción
- 4.- Aceite
- 5.- Crema
- 6.- Talco
- 7.- Productos diversos Para Bebes-Niños

##### **B.- PRODUCTOS COSMÉTICOS PARA EL AREA DE LOS OJOS**

- 1.- Delineador De Ojos
- 2.- Sombras De Ojos
- 3.- Lápiz De Cejas, Lápiz De ojos
- 4.- Mascaras Para Pestañas

5.- Removedor De Maquillajes Para Ojos

6.- Productos diversos Para El Área De Los Ojos

#### C.- PRODUCTOS COSMÉTICOS PARA LA PIEL

1.- Rubor

2.- Polvo Facial

3.- Maquillaje Para Piernas Y Cuerpo

4.- Corrector Facial

5.- Base De Maquillaje (Líquido, Cremoso)

6.- Crema Facial

7.- Loción Facial

8.- Loción Para Manos Y Cuerpo

9.- Cremas Para Manos Y Cuerpo

10.- Mascaras Faciales

11.- Talcos Para Los Pies

12.- Diferentes Productos Cosméticos Para La Piel.

#### D.- PRODUCTOS COSMÉTICOS PARA LOS LABIOS

1.- Lápiz Labial

2.- Delineador Labial

3.- Protector Labial

4.- Brillo Labial

5.- Productos diversos Para Los Labios

#### E.- PRODUCTOS COSMÉTICOS PARA EL ASEO E HIGIENE CORPORAL

1.- Jabón

2.- Talco

3.- Sales De Baño

4.- Shampoo De Baño

5.- Paños Y Toallas Húmedas

- 6.- Burbujas Y Geles De Baño
- 7.- Tabletas De Baño
- 8.- Aceites De Baño
- 9.- Productos diversos Para El Aseo E Higiene Corporal

#### F.- PRODUCTOS DESODORANTES Y ANTITRANSPIRANTES

- 1.- Desodorante
- 2.- Desodorante Para Higiene Femenina
- 3.- Desodorante Y Antitranspirante
- 4.- Productos diversos Desodorantes Y Antitranspirantes

#### G.- PRODUCTOS COSMÉTICOS CAPILARES

- 1.- Tintes Para El Cabello
- 2.- Aerosol Para Dar Color
- 3.- Shampoo Coloreados
- 4.- Decolorantes Del Cabello
- 5.- Shampoo
- 6.- Reacondicionador
- 7.- Iluminador Del cabello
- 8.- Gel
- 9.- Laca
- 10.- Neutralizador
- 11.- Laceadores
- 12.- Loción Tónica
- 13.- Mousse
- 14.- Permanentes
- 15.- Productos diversos Para El Cabello

#### H.- PRODUCTOS COSMÉTICOS PARA LAS UÑAS

- 1.- Suavizante De Cutícula

- 2.- Removedor De Esmalte
- 3.- Brillos Para Las Uñas
- 4.- Esmalte
- 5.- Óleo Para Uñas
- 6.- Base De Esmalte
- 7.- Cremas Para Uñas
- 8.- Productos diversos Para Las Uñas

#### I.- PRODUCTOS COSMÉTICOS DE PERFUMERÍA CON LA MISMA FRAGANCIA

#### J.- PRODUCTOS PARA LA HIGIENE BUCAL Y DENTAL

- 1.- Dentífrico (Todo Tipo)
- 2.- Enjuague Bucal (No Medicados)
- 3.- Productos diversos Para La Higiene Bucal Y Dental

#### K.- PRODUCTOS PARA DESPUÉS DEL AFEITADO

- 1.- Lociones Para Después De Afeitado
- 2.- Bálsamo Para Después De Afeitarse
- 3.- Gel Para Después De Afeitar
- 4.- Cremas De Afeitar
- 5.- Jabón Y Espuma De Afeitar
- 6.- Otros Productos Para El Afeitado

#### L.- PRODUCTOS PARA EL BRONCEADO, PROTECCIÓN SOLAR

- 1.- Aceite Bronceador
- 2.- Crema Bronceadora
- 3.- Lociones Bronceadoras
- 4.- Crema Protectora Solar
- 5.- Loción Protector Solar
- 6.- Productos diversos Para El Bronceado Y Protección Solar

#### M.- PRODUCTOS DEPILATORIOS

- 1.- Crema Depilatoria
- 2.- Aceites Depilatorio
- 3.- Gel Depilatorio
- 4.- Cera Depilatoria

#### N.- PRODUCTOS PARA EL BLANQUEADO DE LA PIEL

- 1.- Crema Blanqueadora
- 2.- Loción Blanqueadora
- 3.- Productos diversos Para El Blanqueado De La Piel

### **5.5 Definición de lápices labiales:**

La barra de labios es fundamentalmente una dispersión de colorantes en una base que consiste en una mezcla adecuada de grasas, ceras y aceites (Wilkinson R, Moore J 1990).

Una de las características de la barra de labios es que debe tener apariencias atractivas, es decir, un acabado uniforme, color uniforme, sin defectos como agujeros o por color arena o inclusiones de cristales. Debe conservarse durante toda su vida y empleo; no debe sudar aceite, descascararse, endurecerse, ablandarse, desmoronarse o volverse quebradizo en el rango de temperatura que pueda experimentar, debe ser dermatológico y debe ser seguro por si se ingiere y fácil de aplicar, debe dejar una película encima que sea ni demasiado graso ni demasiado seco, es decir, bastante persistente.(Wilkinson R, Moore J 1990).

Dentro de la cosmética decorativa, las barras labiales son el grupo con mayor popularidad y comercialización. Existe una continua innovación de estos productos, debido a las nuevas modas que se imponen en estos tiempos. Un labial en barra debe tener una superficie homogénea, brillante y lisa, su textura debe ser dura, que impida su deformación ya sea por el uso o por la temperatura del ambiente; debe ser agradable al gusto y al olfato, y, sobre todo, el color sobre los labios debe durar el mayor tiempo posible, además de ser a prueba de agua.

### **5.6 Historia de los labiales**

El lápiz labial sólido se inventó en el Medio Oriente en el siglo X durante la Edad de Oro del islam. Su forma está realizada en crayón y envuelta en seda, por lo que es frágil y difícil de mover. Muchos historiadores asocian su creación con el esteticista Abu al Qasim al Zahrawi.

En el continente europeo, el lápiz labial se volvió popular en el siglo XVI, cuando la reina Isabel I de Inglaterra introdujo la moda de pintarse la cara de blanco y los labios de un rojo brillante. En aquel entonces, el lápiz labial se elaboraba a partir de una mezcla de tinturas botánicas y cera de abejas, un producto que los chinos habían agregado hace siglos para preservar la delicada piel de los labios.

En la dinastía Tang, del siglo VII al X, también se añadían aceites perfumados a los lápices labiales para hacerlos más sensuales.

En la era isabelina, el maquillaje estaba reservado para las féminas y los actores de clase alta, pero en siglos posteriores el empleo de lápiz labial estaba mal visto. Se creía que los cosméticos solo los usaban grupos marginados como actores y prostitutas.

Quizás el empleo más controversial del lápiz labial fue por parte de las sufragistas estadounidenses que desafiaron la prohibición de la discriminación de género apoyada por Elizabeth Arden, quien desafió los estereotipos como mujer que fabricaba y vendía productos. En 1912, Arden pintó los labios de rojo a las sufragistas que marcharon por las calles de Nueva York exigiendo el voto de las mujeres.

El primer lápiz labial que se vendió por los años 1870, se llamó Ne m'Oubliez Pas (No me olvides), este labial fue comercializado por la compañía francesa de cosméticos Guelain.

Uno de los fundamentales momentos y épicos en la historia del desarrollo de los lápices labiales, fue la creación del contenedor en forma de tubo metálico, muchos atribuyen este invento al estadounidense Maurice Levy en el año 1915. Sin embargo, no fue hasta el año 1923 que el primer contenedor giratorio fue patentado por James Bruce Mason Jr. Este novedoso empaque, que en la actualidad se sigue usando, hizo posible que el transporte de este cosmético sea más fácil de llevar a cabo.

En la década de 1930, Max Factor comercializó los primeros brillos de labios, momento en el que el lápiz labial se hizo tan popular que incluso se utilizó como arma para levantar la moral durante la Segunda Guerra Mundial, dejando atrás su mala reputación.

## **5.7 Importancia de los conservantes**

Por su propia naturaleza, los conservantes son biocidas, compuestos que interfieren con la integridad de la membrana de la célula microbiana, el metabolismo, la función enzimática, la conformación de proteínas, la síntesis macromolecular, etc. Aunque es deseable una acción

selectiva contra los microorganismos para que el producto sea eficaz, muchos conservantes pueden ser algo tóxico para los humanos. Un objetivo deseable de los químicos de formulación es tener un sistema conservante suave pero efectivo. Los conservantes mencionados en la Tabla 1 son seguros y efectivos en las concentraciones permitidas.

Los productos que se conservan adecuada y microbiológicamente seguros pueden desarrollarse mediante una selección de productos químicos para crear condiciones que tengan efectos bacteriostáticos y/o bactericidas. Los sistemas acuosos con >20 % de alcohol o que contienen productos químicos que mantienen un pH bajo (es decir,  $\text{pH} < 3$ ) o una  $a_w$  baja (es decir,  $a_w < 0,6$ ) no permitirán el crecimiento de microorganismos que han sido un problema para las industrias cosmética y farmacéutica. Se pueden usar combinaciones de ingredientes para interferir en la proliferación microbiana en los productos. Orth et al. informaron que los homopolímeros/copolímeros de metilparabeno y ácido acrílico tienen actividad sinérgica anti-Pseudomonas in vitro. Estos investigadores, también, observaron una acción similar con EDTA y metilparabeno.

**Tabla 1: Conservantes permitidos en EE. UU., Comunidad europea y Japón**

Conservante	Máximo nivel permitido (%)
Benzyl alcohol	1
Chlorhexidine	0.3
Chlorphenesin	0.3
Methylparaben, Propylparaben, Ethyl- paraben, Butylparaben, Isopropylparaben , Isobutylparaben	0.8
Phenoxyethanol	1
Sorbic acid	0.6

## 5.8 Parámetros de calidad microbiológica en labiales

Los ensayos microbiológicos determinan la presencia de microorganismos que puedan causar un daño a la salud del usuario final, dentro de estos microorganismos están incluidos tanto las bacterias como los hongos.

Estos ensayos se realizan en todo el proceso productivo de la Planta de Producción, es decir en los productos recién fabricados llamados en la industria como productos a granel o semi elaborados y en los productos ya envasados o productos terminados con la finalidad de verificar la calidad microbiológica de los procesos.

Los resultados de estos ensayos deben de cumplir con la normativa vigente del país para que puedan salir a la venta.

## 5.9 Límites microbiológicos de los lápices labiales

En el Perú, nos regimos según lo que indica la Resolución N°1418 de la Comunidad Andina, las especificaciones se muestran en la tabla 2:

**Tabla 2: Especificaciones de Límites microbianos para cosméticos según Resolución N° 1418 de la CAN**

ÁREA DE APLICACIÓN	Requisitos	Límites de aceptabilidad
Productos cosméticos susceptibles a contaminación microbiológica	Microorganismos mesófilos aerobios totales	Límite máximo 5 x 10 <sup>3</sup> UFC/g o mL
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia en 1g o mL
	<i>Escherichia coli</i>	Ausencia en 1g o mL
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia en 1g o mL

Sin embargo, para esta tesis se adoptarán los límites microbianos de la Resolución N° 231-2008 del Consejo de ministros de Integración Económica (COMIECO) por considerarse de mayor exigencia (Ver Tabla 3):

**Tabla 3: Especificaciones de Límites microbianos para cosméticos según Resolución N°231-2008 de COMIECO**

PRODUCTO	DETERMINACION	ESPECIFICACION
Todos los otros	Recuento total de Mesófilos aerobios	Límite máximo $1 \times 10^3$ UFC/g o mL
	Recuento Total de Mohos y Levaduras	Límite máximo $1 \times 10^2$ UFC/g o mL
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia en 1g o mL
	<i>Escherichia coli</i>	Ausencia en 1g o mL
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia en 1g o mL

## 5.10 Microorganismos patógenos de importancia en la industria cosmética

### 5.10.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* del grupo de los coliformes es una bacteria de la familia Enterobacteriaceae que puede colonizar el tracto gastrointestinal de los niños a las pocas horas del nacimiento y establecer una relación mutua estable con el huésped. Con respecto a la flora normal de humanos y varios animales, se estima como indicador de contaminación fecal cuando está presente en el medio ambiente, los alimentos y el agua, junto con otras bacterias análogas clasificadas como "coliformes" (Brooks G. Butel J. Morse, S. 2011).

Al consumir alimentos que contengan esta bacteria, se pueden adquirir infecciones gastrointestinales. De la misma manera, se pueden adquirir infecciones si se bebe por accidente agua de piscina contaminada con desechos humanos (Brooks G. et al).

### **5.10.2 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* está presente (generalmente de forma transitoria) en la nariz de alrededor del 30% de los adultos sanos y en la piel de alrededor del 20% de los adultos sanos.

Tienen la facultad de originar infección a medida que entran en la piel mediante una herida abierta, una llaga o a través de un catéter o tubo de respiración. La infección puede ser leve, localizada (como un grano) o más grave (Moreillon P. 2011)

### **5.10.3 *Pseudomonas aeruginosa***

Este organismo es patógeno cuando ingresa en sitios sin defensas normales, como las membranas mucosas y la piel dañada directamente por lesión tisular a través de catéteres intravenosos o catéteres urinarios, o cuando se presenta neutropenia, como en la quimioterapia contra el cáncer. Las bacterias se adhieren a la membrana mucosa o a la piel, penetran localmente y causan enfermedades sistémicas. El lipopolisacárido tiene un papel directo en causar síndrome de emaciación en adultos, coagulación intravascular diseminada, leucopenia, leucocitosis, oliguria y fiebre. (Brooks G. et al 2011).

## **5.11 Importancia clínica de la contaminación microbiana**

Los microorganismos tienen estrategias de supervivencia que les permiten adaptarse para resistir condiciones adversas y utilizar una amplia gama de sustratos como nutrientes. Las estrategias de supervivencia son las características morfológicas que protegen y las características fisiológicas que permiten a los microorganismos responder a las condiciones cambiantes de su entorno. Las estrategias de supervivencia se convierten en factores de virulencia en el proceso de la enfermedad porque potencian la invasividad y/o toxigenicidad de los microorganismos. La piel humana es una barrera extremadamente eficaz contra las infecciones, y no se han informado ejemplos de bacterias que puedan penetrar la piel intacta sin ayuda. Los mecanismos protectores de la piel incluyen la falta de humedad [baja actividad de agua ( $a_w$ )], el pH ácido, la exfoliación continua de los corneocitos, la microflora residente de la piel que compete con el potencial invasores de nutrientes y sitios de colonización, lisozima

(en poros, folículos pilosos y glándulas sudoríparas) que degrada las paredes celulares bacterianas y lípidos antimicrobianos.

Enfermedades producidas por *Staphylococcus aureus*:

Tienen la facultad de provocar infecciones a medida que ingresan a la piel por medio de una herida abierta, una úlcera, un tubo de respiración o un catéter. La infección puede ser menor y local (tal como un grano) o puede tener una importancia mayor. (Moreillon P. 2011)

Generalmente, las infecciones por este microorganismo se muestran en sujetos inmunodeficientes. Las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina se les conoce como infección por MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) un tipo de microorganismo latentemente peligroso que resiste a varios antibióticos y origina infecciones de la piel entre otras (Moreillon P. 2011).

La forma de contagio es mediante contacto directo con otra individuo infectado o componentes contaminados con la bacteria. El tratamiento está relacionado con cuidados médicos intrahospitalarios o sus siglas HAMRSA (Hospital acquired or health care associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*).

Entre las infecciones más comunes de *St. aureus* tenemos:

Orzuelo (*Hordeolum*): Infección por estafilococos que afecta al párpado. Se origina cuando las glándulas conectadas a la base de las pestañas se irritan o inflaman. Los síntomas más comunes del orzuelo generalmente son hinchazón rojiza, caliente, molesta y a veces dolorosa cerca del borde del párpado (Teenshealth. 2009).

Impétigo: Infección cutánea superficial que se produce con mayor periodicidad en infantes, aunque también tiene la facultad de darse en adolescentes y adultos. Por lo general, estas infecciones afectan al rostro o extremidades. La primera afección por impétigo es un pequeño granito o ampolla que luego desarrolla una costra de color miel. No se han registrado casos de fiebre o dolor, aunque estas ampollas pueden picar y extenderse a otras partes del cuerpo (Teenshealth. 2009).

Celulitis: Infección que afecta a la piel y a áreas de tejido subcutáneo. Comienza con un pequeño parche de piel roja, sensible, caliente e hinchada. A medida que el área comienza a propagarse, el sujeto afectado puede experimentar molestias y fiebre. La celulitis puede aparecer en cualquier parte del cuerpo, pero es más común en las piernas (Teenshealth. 2009).

Infecciones Cutáneas: Generalmente ocasionan inflamación, enrojecimiento y dolor en la piel. Otros síntomas son:

- Inflamación cutánea.
- Secreción de pus u otros líquidos del sitio.
- Fiebre.
- Calentamiento alrededor del área infectada.
- Problemas respiratorios.
- Escalofrío.
- Dolor en el pecho.
- Cansancio.
- Dolores musculares.
- Dolor de cabeza

Enfermedades producidas por *Candida albicans*:

*Candida albicans* produce infecciones superficiales en piel, uñas y mucosas. No obstante, las candidiasis más graves (candidiasis diseminadas) se muestran en sujetos con sistema inmunológico débil o con padecimientos subyacentes que inducen a sufrir esta infección (Berkhout, R. 2008).

La candidiasis cutánea o mucosa se genera a efecto del crecimiento de la población de *Candida* y del daño al epitelio, que faculta la colonización local por la levadura y las pseudohifas. La candidiasis sistémica se origina cuando *Candida* ingresa al torrente sanguíneo y el huésped no posee las defensas fagocíticas adecuadas para contrarrestar su desarrollo y diseminación. Desde el sistema circulatorio, la *Candida* puede afectar los riñones, adherirse a las prótesis valvulares cardíacas o generar infección candidiásica casi en cualquier parte.

La histología local de las lesiones cutáneas o mucocutáneas es caracterizada por generar reacciones inflamatorias que varían desde abscesos hepáticos piógenos hasta granulomas crónicos. Las lesiones presentan abundantes yemas de levaduras y pseudohifas.

Enfermedades producidas por *Escherichia coli*

Por lo general, *Escherichia coli* es inofensiva. No obstante, algunos tipos producen enfermedades y diarrea.

*Escherichia coli* enterotoxigénica causa la diarrea del viajero; *Escherichia coli* enterohemorrágica produce diarrea hemorrágica y tiene la facultad de originar insuficiencia renal o muerte. Estos problemas son más probables de ocurrir en infantes y en adultos con un sistema inmunológico debilitado (Brooks G. et al S. 2011).

#### Enfermedades producidas por *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa*: Es un microorganismo patógeno cuando penetra regiones desprovistas de defensas normales, tal como mucosas y piel lesionada por daño tisular directo; el uso de catéteres intravenoso o urinario; o cuando hay neutropenia, como en la quimioterapia contra el cáncer. Las bacterias se acoplan a las mucosas o la piel y las colonizan, invaden de manera local y generan una enfermedad sistémica. Origina infecciones en heridas y quemaduras originando pus de color azul verdoso. A medida que ingresa por punción lumbar produce meningitis, causa infección del aparato urinario cuando la vía de entrada son catéteres, instrumentos o soluciones irrigantes. La afección del aparato respiratorio, especialmente por aparatos respiradores contaminados, forma neumonía necrosante. Este patógeno se muestra con asiduidad en la otitis externa leve de los nadadores y en la otitis externa invasora (maligna), en pacientes diabéticos. La infección del ojo, que puede conllevar a su destrucción rápida, se da lugar, con mayor periodicidad luego de procesos y lesiones quirúrgicas. En la mayoría de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* los síntomas y signos son inespecíficos y se asocian con el órgano afectado. La verdolglobina (causada por la descomposición de la hemoglobina) o los pigmentos fluorescentes a veces se pueden detectar en la orina y las heridas. La necrosis hemorrágica de la piel casi siempre está presente en la sepsis por *Pseudomonas aeruginosa*; las lesiones denominadas abscesos gangrenosos están rodeadas de eritema y por lo general no presentan pus. (Brooks G. et al 2011)

### **5.12 Factores determinantes de la contaminación del producto**

La formulación del cosmético es fundamental en el proceso productivo, no solo porque es la base de las cualidades físico químicas y organolépticas de los productos sino también porque desde la fórmula se puede evitar o favorecer el desarrollo de microorganismos.

Existen agentes emulsificantes utilizados en formas cosméticas que pueden crear ineficacia en el sistema preservante, por ejemplo, el preservante P-benzofenólico puede ser inactivado si es que la fórmula también contempla emulsificantes no iónicos. Sin embargo, a nivel de preservantes se puede crear sistemas que conjuguen dos o más dentro de las exigencias

por la legislación y por la naturaleza del producto final, con la finalidad de inhibir la proliferación microbiana como, por ejemplo, DMDMH y el Methylchloroisothiazolinone and methylisothiazolinone ambos al 0.1 %.

Cabe resaltar que el objetivo de los preservantes en las fórmulas cosméticas es evitar la contaminación del producto en el uso diario que le dé el cliente final ya que los microorganismos que se encuentran las manos, piel y/o ambiente pueden llegar a proliferar en el producto y producir enfermedades en la piel.

La bacteria más frecuente en cosméticos es el *Staphylococcus aureus*, capaz de provocar infecciones como conjuntivitis bacteriana e impétigo. Otros microorganismos que se suman a los identificados en cosméticos son *E. coli*, *Pseudomonas* y hongos.

El acné es otra enfermedad de la piel que puede ser causada o agravada por el uso de productos cosméticos contaminados.

Vásquez, A (2015) afirma que para desarrollo de los microorganismos se deben tener en consideración diversos factores:

Humedad, por ser una condición favorable para la proliferación, sobre todo de los hongos.

Temperatura, por lo que clasificamos a los microorganismos en mesófilos (microorganismos que proliferan a una temperatura entre 20 a 37°C), psicrófilos (bacterias que se desarrollan entre 4 - 10°C) y termófilos (microorganismos que viven a altas temperaturas).

Disponibilidad de oxígeno: Determina que existan o no microorganismos aerobios facultativos y estrictos.

Actividad superficial y presión osmótica; debido a que el microorganismo posee una membrana semipermeable y toda alteración drástica en el medio tiene la facultad de originar deshidratación, ruptura o dilatación de estas membranas.

Actividad de agua, en presencia de solutos, debido a que el soluto atrapa la molécula del agua, y, por tanto, la cantidad del agua disminuye.

Que exista una actividad baja de agua limita a los microorganismos en su proliferación, por lo que terminan pereciendo. La actividad de agua que se requiere con el fin de su desarrollo se puntualiza en la tabla siguiente:

**Tabla 4: Requerimiento de aw de microorganismos**

Microorganismos	aw requerida
Especies de <i>Pseudomonas</i>	> 0.96
Enterobacterias	> 0.93
<i>Staphylococcus aureus</i>	> 0.86
Levaduras	> 0.70
Mohos	> 0.60

Productos con valores de actividad de agua por debajo de los que indica la tabla, no necesitarían agregar conservantes contra este microorganismo, porque de manera teórica, solamente tendría la facultad de presentar desarrollo fúngico.

Como ya hemos visto, son diversos los factores que promueven el crecimiento microbiano, por lo que el valor que se puntualiza en la tabla solamente debe considerarse como guía.

También es importante considerar cuál es el uso que el consumidor le dará finalmente, y cuál es el tipo de envase primario que tendrá el producto, ya que este tiene un papel importante en control de la contaminación microbiana.

En relación con las materias primas, la falta de aw es una característica suficiente con el fin de conservar el insumo adecuadamente, cada vez que se fabrique y se mantenga en una situación aséptica. Esto no involucra que quede libre de controles microbiológicos, debido a que, el microorganismo puede sobrevivir (sin proliferarse) en condiciones no óptimas, hasta que encuentren el medio necesario para desarrollarse y reproducirse.

pH:

Los pH ácidos o alcalinos permiten que las células requieran consumir energía en conservar constante su pH interno en la neutralidad lo que genera que no pueda reproducirse. Si a esta situación adversa de pH se aumenta la existencia de glicoles, antioxidantes, una actividad baja de agua o una elevada concentración de tensioactivos, se origina una condición que no tiene la facultad de proteger un desarrollo microbiana.

Los pH ácidos son propicios para la proliferación de levadura y moho. Si el pH se localiza menor 3, la condición no permitirá algún tipo de proliferación microbiana, sin embargo, puede existir alguna excepción. Asimismo, también crea una condición hostil a pH>10 y en realidad es parte del sistema conservante en algunos cosméticos como los productos depilatorios, alisadores/permanentes, jabones, etc. De este modo, si el pH es alcalino(>10) no será requisito añadir otro conservante dentro de la fórmula al producto o a la materia prima, aunque esto no exime del control microbiológico de estas últimas (tal como en materias primas de origen natural, tiene la facultad de presentar esporas – de origen fúngico o bacteriano - que sobrevive a pH extremos). Un pH por debajo de 3 obviamente no favorece el desarrollo de microorganismos, sin embargo, puede existir algunos tipos de microorganismos que pueden prosperar a este pH o menos.

Ingredientes Hostiles en la formulación:

- Alcoholes
- Agentes oxidantes y reductores
- Amoníaco y monoetanolamina
- Tensioactivos
- Ingredientes activos
- Disolventes orgánicos polares
- Gases propelentes
- Compuestos quelantes
- Antioxidantes

Ingredientes interferentes con los conservantes

Entre las materias primas que más se asocian a la pérdida de actividad de conservantes encontramos partículas de origen mineral (caolín, arcillas, mica, silicatos, etc.), gomas naturales (goma xantana), pigmentos, iones metálicos, partículas de carbonatos, proteínas, lecitina, polisorbatos, etc., a las que los conservantes pueden adsorberse y no estar disponibles para realizar su acción. Un factor para tener en cuenta es la presencia de partículas (minerales o vegetales) que encontramos, por ejemplo, en productos exfoliantes. Es importante que la solución que humecte estas partículas esté desde un principio ya conservada, es decir, es aconsejable añadir los conservantes al solvente que va a rodear estas partículas.

Los filtros solares UV orgánicos pueden inactivar los conservantes, sobre todo a algunos donadores de formaldehído; del mismo modo, los filtros inorgánicos pueden unirse a los conservantes, como las partículas mencionadas anteriormente. Los proveedores de conservantes también suministran datos acerca de las incompatibilidades con diferentes procesos, como la alta temperatura, o pH extremos. Otros parámetros pueden condicionar la estabilidad de los conservantes; un ejemplo son los que poseen poca solubilidad en agua, que les puede afectar al orden de adición, ya que el conservante puede ser insoluble de forma transitoria y no incorporarse bien en el preparado. Puede ocurrir, también, que un conservante lipófilo disuelto en la fase oleosa quede fijo en esta fase, dejando la fase acuosa (crítica) sin conservar. Es muy importante conocer el coeficiente de partición de los conservantes e intentar disolverlos siempre en la fase acuosa. La partición o migración de los conservantes en el procesado e incluso en los componentes del envase pueden guiar sobre el tipo de conservante necesario y la elección de materiales

#### Temperatura de Fabricación

Una temperatura por encima de 65°C mantenida durante 10 minutos puede provocar que las células vegetativas de los microorganismos mueran; es decir, un producto que se fabrique y envase a 65°C se podría considerar de bajo riesgo microbiológico y podría, en principio, formularse sin conservantes. Sin embargo, a esta temperatura las esporas bacterianas y fúngicas sobreviven y podrían reproducirse posteriormente (sobre todo si hay agua de condensación), por lo que la aplicación de buenas prácticas de fabricación (incluyendo el control microbiológico de las materias primas) es fundamental para lograr un producto de buena calidad microbiológica.

En relación con la temperatura de fabricación, debemos tener en cuenta que algunos conservantes son sensibles a la temperatura elevada (donadores de formol, isotiazolinonas, etc.) por lo que deben de ser añadidos en la fase de enfriamiento. Si el proceso de fabricación comienza a 80°C, en este momento toda la mezcla ya está conservada gracias a la elevada temperatura, por lo que se puede añadir los conservantes en una fase posterior cuando la temperatura sea inferior (hay excepciones, por ejemplo si se utilizan parabenos u otras sustancias con acción antimicrobiana que necesitan calor para disolverse, ya que éstos se deben disolver preferiblemente en agua a 80°C para que permanezcan en la fase acuosa, si es que no utilizamos otros solventes). Por el contrario, si el proceso es en frío y no existe ninguna

característica que reduzca el riesgo (pH extremo, concentrado de tensioactivos, etc.), se deben añadir los conservantes en la primera fase, siempre que sea posible.

### Tipo de envase

Es un elemento que previene el ingreso de contaminantes por parte del consumidor. Es indispensable saber, para realizar la evaluación del riesgo y elegir los conservantes adecuados, reducir su concentración o incluso prescindir de ellos, si el producto va a envasarse en un envase microbiológicamente seguro (monodosis, botella, bomba dosificadora, tubo, sistemas airless, spray, etc.) o bien en uno que no lo es, como un tarro de boca ancha, o si el producto va a estar en contacto con elementos aplicadores (pinceles, brochas, cepillos, esponjas), o con liners de cartón (pieza que se coloca en la tapa por su parte interior). En el caso en que el consumidor vaya a acceder al producto con sus dedos y haya una gran superficie expuesta al ambiente, es necesario una conservación efectiva contra el crecimiento fúngico además del bacteriano (si la fórmula no contiene otros ingredientes fungicidas y bactericidas) y, si la actividad de agua es muy baja, sobre todo debemos conservarlo para prevenir el crecimiento de mohos. Como el envase es una barrera a la contaminación microbiana, es, por lo tanto, parte del sistema conservante. Por ejemplo, en el caso de los aerosoles el envase es una barrera efectiva ante el consumidor y además el propelente ejerce una acción conservante. Del mismo modo, los envases monodosis previenen de la proliferación microbiana, ya que el consumidor los utiliza una sola vez. La utilización de bombas y dosificadores, o más recientemente, sistemas de cierre que incluyen membranas flexibles que se abren al presionar el tubo y se cierran al cesar la presión, limitan el ingreso de contaminantes y de esta manera mantienen la calidad microbiológica del producto.

Los cosméticos, especialmente las cremas, tienen orígenes atractivos y distantes en la historia humana. Existe un precedente del antiguo Egipto de que los perfumes y las cremas se fabricaban con el fin de una rutina general.

Los productos cosméticos utilizan una amplia gama de insumos que deben ser analizados en el proceso de aprovisionamiento. El control microbiológico que se realiza a la materia prima no acostumbra a tener diferencias significativas del control aplicado para los productos terminados.

El principio de una contaminación microbiana en productos cosméticos puede darse por múltiples razones tales como la utilización de materias primas en el proceso de fabricación, condiciones de limpieza no aptas para el proceso de envasado, materiales de envase contaminados por proveedor o por almacén o por una gran cantidad de diseminación de microorganismos en el ambiente. Generalmente esta contaminación es invisible a los ojos del usuario final, ya que solo puede determinarse por procedimientos microbiológicos que se dan dentro de un laboratorio.

Muchos de los microorganismos que pueden contaminar un cosmético no producen un daño directo a la salud, pero cuando el producto tiene contacto directo con la piel puede originar infecciones leves, severas y hasta mortales.

Pero más allá de los problemas a la salud que pueden causar los productos cosméticos contaminados, la microbiología cosmética tiene como objetivo determinar la contaminación microbiana para que este producto no salga a la venta y no afecte al usuario final, además de salvaguardar la conservación del producto y que no interfiera con los beneficios que este ofrece.

## VII

## HIPÓTESIS

H0: Los ensayos microbiológicos realizados a los lápices labiales comercializados en el mercado de Salamanca de Monterrico- Ate no evidenciarán contaminación microbiana fuera de la especificación según las normativas.

H1: Los ensayos microbiológicos realizados a los lápices labiales comercializados en el mercado de Salamanca de Monterrico- Ate evidenciarán contaminación microbiana fuera de la especificación según las normativas.

## VIII

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Lugar de ejecución:

El desarrollo del análisis microbiológico se efectuó en el Laboratorio de Microbiología de la empresa Life Beauty Corporation ubicado en el distrito de Chorrillos.

Obtención de las muestras:

Se procesaron 50 muestras que fueron adquiridas al azar en los puestos de venta de cosméticos de los mercados de Salamanca de Monterrico – Ate.

Los lápices labiales fueron nuevos y se consideraron 3 lápices labiales del mismo lote y tono como una muestra, esto debido al peso que se necesita para la fase experimental.

### 8.2 Preparación de los Medios de Cultivo:

Los medios de cultivo fueron preparados según las indicaciones brindadas por el fabricante utilizando agua destilada.

Se tomó el pH de los medios de cultivos preparados antes y después del proceso de autoclavado, obteniendo valores dentro del rango indicado por el proveedor de cada medio.

Luego del autoclavado de los medios de cultivo, se procedió a realizar la prueba de esterilización incubando en una placa o frasco (según corresponda) por 24 horas a la temperatura y tiempo correspondiente para cada medio. Los resultados se encontraron conformes por lo cual los medios de cultivo estuvieron aptos para su uso.

### **8.3 Preparación de la muestra para análisis Microbiológico:**

Se raspó de manera aséptica la muestra con una espátula estéril sobre una placa Petri estéril. Luego se pesó 10g de la muestra y se agregó a un frasco que contiene 90mL de Caldo digerido caseína-soja-polisorbato (TSB).

Se homogenizó bien, agitando el frasco en sentido horario y antihorario, y se dejó en reposo durante 20 minutos con el fin de que se neutralice la acción del conservante.

### **8.4 Recuento de microorganismos Aerobios Mesófilos Totales según NTP ISO 21149.2014 y Recuento Total de Mohos y Levaduras según USP 43**

Se recogió 1 mL de la dilución  $10^{-1}$  y se situó en una placa Petri estéril, a esta, se le agregó aproximadamente 20 mL de agar Soja Trypticosa (TSA), después se recogió 1 mL de la dilución  $10^{-1}$  y se situó en otra placa Petri estéril y se le agregó 20 mL de agar Sabouraud Dextrosa aproximadamente. Este procedimiento se realizó por duplicado.

Se dejó solidificar el agar. Las placas estuvieron debidamente rotuladas con el código correspondiente, nombre del medio de cultivo y fecha de análisis.

Se incubaron en posición invertida a  $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  durante 72 horas + 6 horas para el análisis del microorganismo aerobio mesófilo y para la levadura y moho se incubaron las placas sin invertirlas a  $22.5 + 2.5^{\circ}\text{C}$  durante 5 a 7 días.

### **8.5 Detección de Patógenos**

#### **Pre-Incubación**

Se incubaron los frascos a  $32.5\text{ °C} \pm 2.5\text{ °C}$  durante 20 a 24 horas. Luego se procedió de la siguiente manera:

### **8.6 Investigación de *Escherichia coli* según NTP ISO 21150.2017:**

Se agitaron los frascos para homogenizar y usando un asa de siembra esterilizada, se inoculó por agotamiento una alícuota del medio incubado sobre la superficie de agar Mac Conkey, para obtener colonias aisladas.

Se invirtieron las placas e incubaron a  $32.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. El crecimiento de colonias indicaría la probable presencia de *Escherichia coli*.

#### **8.7 Investigación de *Pseudomonas aeruginosa* según NTP ISO 21117.2017:**

Se agitaron los frascos para homogenizar y usando un asa de siembra esterilizada, se inoculó por agotamiento, una alícuota del medio incubado sobre la superficie del agar Cetrimide, para obtener colonias aisladas.

Se invirtieron las placas e incubaron de  $32.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. El crecimiento de colonias con pigmento verdoso indicaría la probable presencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

#### **8.8 Investigación de *Staphylococcus aureus* según NTP ISO 21118.2017:**

Se agitaron los frascos para homogenizar y usando un asa de siembra esterilizada, se inoculó por agotamiento una alícuota del medio incubado sobre la superficie del agar Manitol Salado, para obtener colonias aisladas.

Se invirtieron las placas e incubaron de  $32.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. El crecimiento de colonias indica la probable presencia de *Staphylococcus aureus*.

Se identificó la especie realizando un repique en Agar Baird Parker, dejando incubar por 24 horas a  $32.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; además se realizó coloración Gram, y prueba de Coagulasa.

### 9.1 Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos Aerobios

Del 100% de las muestras analizadas, según la NTP ISO 21149.2014 el 90% tuvo un resultado  $<10$  ufc/g (Tabla 4), y el 10% presentaron recuentos, pero dentro de especificación conforme se puntualiza en la Tabla 5.

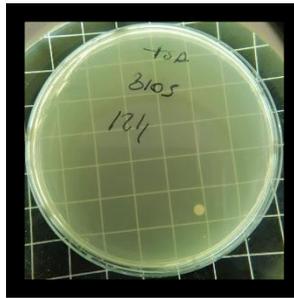
**Tabla 5: Productos con recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos Viabiles**

Marca	Tono	Microorganismos Aerobios Mesófilos Viabiles (UFC/mL)
Flower Secret	6	50
Handayan	13	10
Charmacy	60	120
Charmacy	69	10
Focallure	7	20
Focallure	15	60
Langmanni	9	10

**Tabla 6: Muestras con recuento  $< 10$  UFC/g de Microorganismos aerobios Mesófilos viabiles**

Marca	Tono	Microorganismos Aerobios Mesófilos Viabiles (UFC/mL)
Huxiabeauty	5	$< 10$
TLM	7	$< 10$
Flower Secret	6	$< 10$
Flower Secret	10	$< 10$

Revel	4	< 10
TLM	6	< 10
Flower Secret	8	< 10
Ever Beauty	901	< 10
Flower Secret	10	< 10
Flower Secret	11	< 10
Ever Beauty	218	< 10
Flower Secret	7	< 10
Huxiabeauty	4	< 10
Flower Secret	'07	< 10
Flower Secret	9	< 10
Revel	'02	< 10
TLM	7	< 10
Flower Secret	1	< 10
Teayason	'05	< 10
Teayason	10	< 10
Teayason	'08	< 10
Handayan	'04	< 10
Handayan	2	< 10
Handayan	12	< 10
Handayan	'07	< 10
Charmacy	65	< 10
Charmacy	63	< 10
Charmacy	66	< 10
Charmacy	67	< 10
Charmacy	74	< 10
Focallure	'01	< 10
Focallure	'06	< 10
Focallure	11	< 10
Focallure	13	< 10
Focallure	18	< 10
Langmanni	'03	< 10
Langmanni	'06	< 10
Langmanni	'08	< 10
Langmanni	'04	< 10
Langmanni	'07	< 10
Kiss	'03	< 10
Kiss	11	< 10
Kiss	14	< 10



**Figura 3: Crecimiento de microorganismos aerobios**

### **9.2 Determinación de *Escherichia coli***

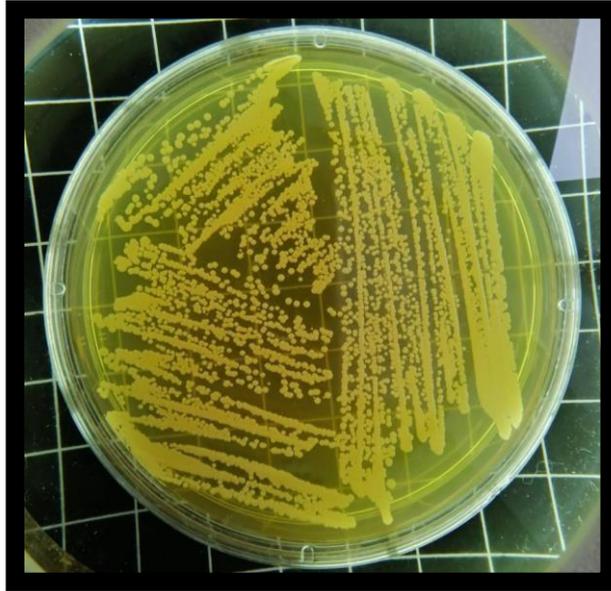
No se alcanzó ningún resultado con existencia de *Escherichia coli*.

### **9.3 Determinación de *Staphylococcus aureus***

Se alcanzaron 2 resultados con existencia de *Staphylococcus aureus* (Tabla 6) los cuales fueron confirmados tras realizar el repique en agar Baird Parker y la prueba de coagulasa.

**Tabla 7: Lista de productos con Presencia de *Staphylococcus aureus***

Marca	Tono	<i>St. Aureus</i>
Handayan	07	<i>Presencia</i>
Focallure	13	<i>Presencia</i>



**Figura 4:** Colonias típicas de *Staphylococcus aureus* en agar Manitol salado



**Figura 5:** Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en Baird Parker

**Figura 6:** Prueba de Coagulasa Positiva



También se evidenciaron en 3 muestras crecimiento de colonias rosadas en Agar Manitol Salado las cuales fueron repicadas en agar Baird Parker para descartar que se traten del patógeno en investigación teniendo como resultado Ausencia de *St. aureus*.

#### 9.4 Determinación de *Pseudomonas aeruginosa*

En todas las muestras analizadas se obtuvo ausencia de este patógeno.

#### 9.5 Recuento Total de Mohos y Levaduras

El 36% de las muestras procesadas evidenciaron crecimiento de mohos y levaduras (Tabla N°8).

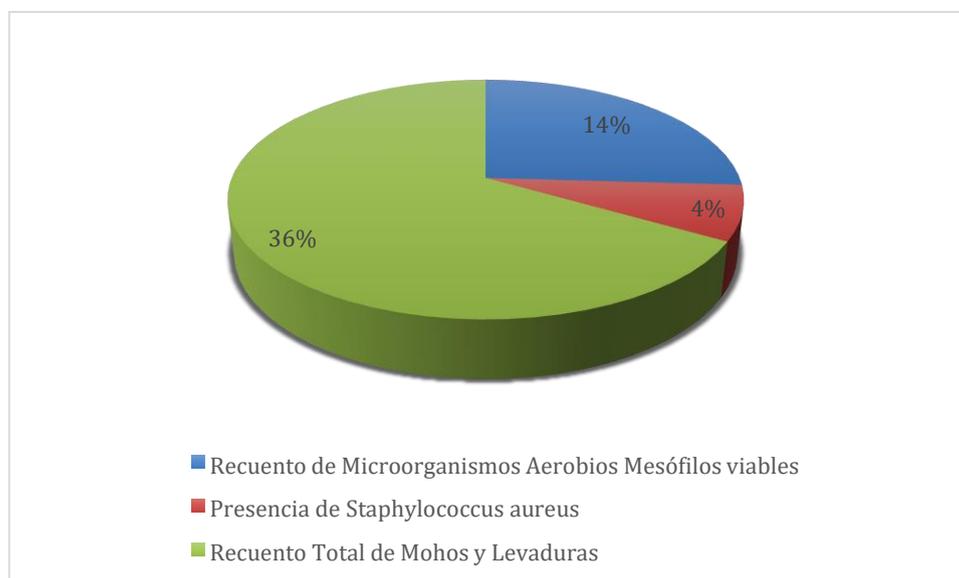
**Tabla 8: Muestras con Recuento de Mohos y Levaduras**

Marca	Tono	Recuento Total de Mohos y Levaduras (UFC/mL)
Huxiabeauty	5	490
TLM	7	140
Flower Secret	6	3470
Flower Secret	10	330
Revel	4	MNPC
TLM	6	50
Flower Secret	8	710
Ever Beauty	901	160
Flower Secret	10	150
Flower Secret	11	790
Ever Beauty	218	140

Flower Secret	7	1730
Huxiabeauty	4	760
Flower Secret	107	280
Flower Secret	9	40
Revel	102	530
TLM	7	200
Flower Secret	1	820

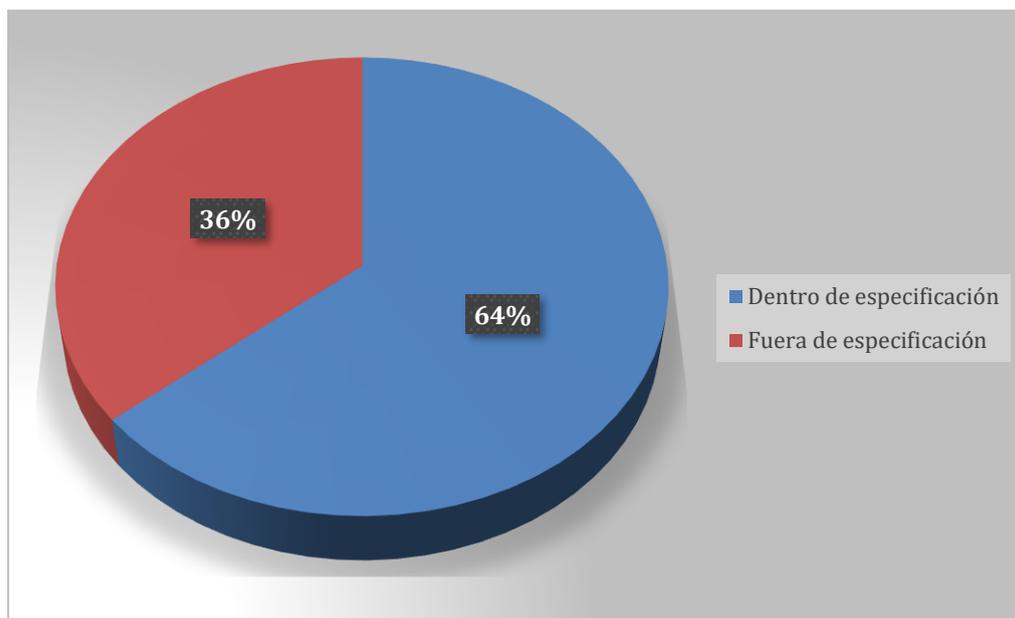
En el cuadro 1 se puntualiza el resumen por porcentajes de las muestras que presentaron contaminación. El 30% de las muestras analizadas presentaron recuento total de levadura y moho, el 4% presentaron presencia de *St. aureus*, mientras que el 10% presentó crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos viables.

**Figura 7: Porcentaje del tipo de contaminación hallada**



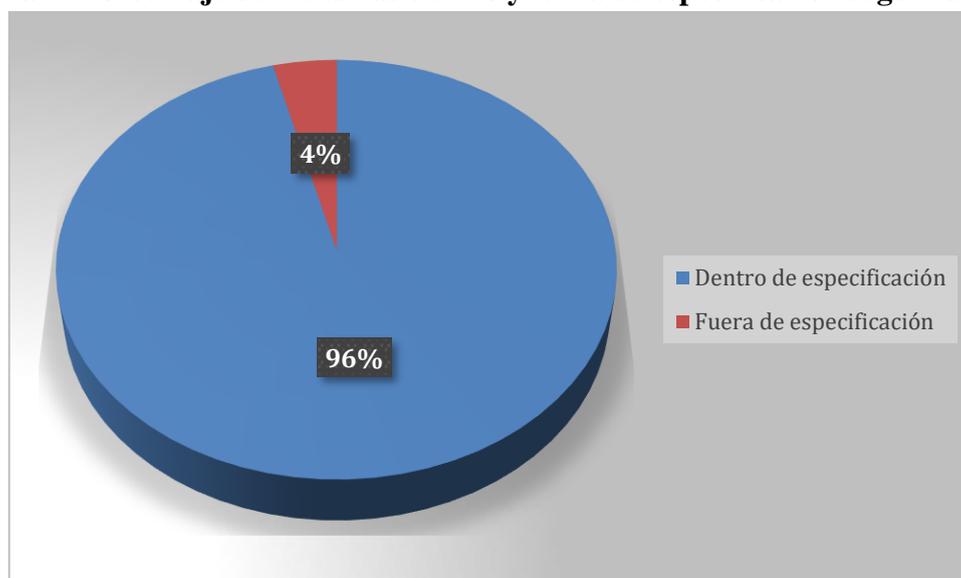
En cuanto el recuento total del Moho y Levadura, el cuadro 2 puntualiza que el 64% de las muestras evaluadas estuvieron dentro de los límites permisibles por la COMIECO.

**Figura 8: Porcentaje de muestras con resultado fuera de especificación para recuento total de Mohos y levaduras**

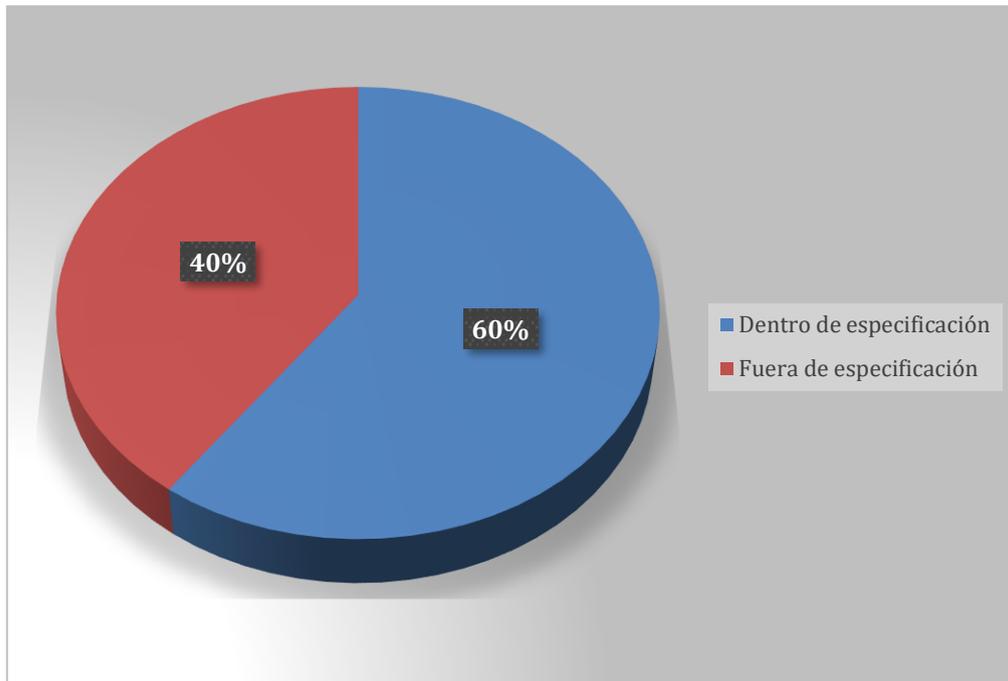


Teniendo en cuenta los criterios de la CAN y la COMIECO, en el cuadro 3 y 4 se presenta cuánto es el porcentaje de muestras aprobadas según las especificaciones técnicas microbiológicas:

**Figura 9: Porcentaje de muestras dentro y fuera de especificación según la CAN**



**Figura 10: Porcentaje de Muestras dentro y fuera de especificación según la COMIECO**



La determinación de la calidad microbiológica del producto cosmético es una obligación de las empresas fabricantes para poder realizar la venta, sin embargo, pocos laboratorios cosméticos al momento del desarrollo del producto realizan la prueba de eficacia del sistema preservante (Challenge test o prueba de desafío), prueba que se encarga de evaluar qué tan robusto es este sistema y si el producto final se verá comprometido microbiológicamente durante la utilización del usuario final.

Es común, que, en los puestos de mercados, el cliente antes de concretar la venta abra el lápiz labial para evaluar si el color o la textura de éste es de su agrado, sin embargo, esto involucra un riesgo de contaminación ambiental o de manipulación que puede comprometer la calidad del producto.

El resultado de este análisis puntualiza que el 96% de las muestras analizadas se encuentran dentro de la especificación que la CAN nos brinda, pero esto es debido a que no consideran el recuento total de Mohos y Levaduras.

En países como Nicaragua que se rigen a lo que indica la COMIECO el Recuento total de mohos y levaduras si está especificado teniendo un recuento máximo permisible de  $1.2 \times 10^2$ , por lo que, según nuestros resultados, el 60% no cumple con la especificación.

El 14% de las muestras analizadas evidenciaron un recuento de Microorganismos aerobios mesófilos dentro de especificación, mientras que un 4% presentó presencia de *Staphylococcus aureus*.

El trabajo de tesis realizado por Flores y Acrota, (2017) coincidió con la presente investigación al determinar ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* y evidenciar crecimiento de *Staphylococcus aureus* en lápices labiales comercializados en la ciudad del Cuzco, sin embargo, para el recuento total de moho y levadura, a pesar de que tuvieron recuento, este se encontró dentro de especificación.

En Nicaragua, Cisneros et al (2019). Analizaron labiales que se comercializan en el mercado oriental de la ciudad de Managua obteniendo resultados dentro del límite permitido según la COMIECO.

En el Perú, las investigaciones en lápices labiales son mínimas, sin embargo, se han realizado evaluaciones en cremas faciales y rubores, que, aunque tienen usos diferentes se rigen

a la misma especificación microbiológica que los labiales. En este sentido, Vega, B, et al (2015) analizaron 3 cremas faciales en donde, se hallaron recuentos de microorganismos aerobios fuera de especificación representando un riesgo para la salud del usuario final, así como para la vida útil del producto.

Flores y Chavez (2017) en la ciudad de Trujillo evaluaron 20 muestras de rubores obteniendo un recuento  $< 100$  UFC/g de microorganismos aerobios en el 5 % de las muestras procesadas. Cáceres (2018) evaluó 48 muestras de productos capilares obteniendo que el 17% de las muestras evaluadas se encontraron fuera de especificación para el recuento de microorganismos aerobios, el 17% tuvieron presencia de *Staphylococcus aureus*, el 4% con presencia de *Pseudomonas aeruginosa* y el 2% con presencia de *Escherichia coli*.

Gudiño (2013) también realizó una investigación en cremas faciales obteniendo que en el 35.7 % de las muestras procesadas se evidenciaba existencia de *Escherichia coli*, y el 21.4% de las muestras con existencia de *Staphylococcus aureus*.

Según estos antecedentes, se evidencia que la calidad microbiológica del cosmético no es la apropiada, y que las empresas deberían de poner más énfasis a los riesgos microbiológicos en los procesos de fabricación y envasado de sus productos.

Teniendo en cuenta los resultados podemos inferir que no todos los productos cumplen con un control de calidad riguroso, y esto puede repercutir en la salud de los usuarios finales. Jalón, F. (2017) realizó una investigación en donde determinó la contaminación microbiológica de maquillaje compartido, en donde examinaron 52 muestras relacionadas a las infecciones oculares

La presente investigación evaluó microbiológicamente 10 marcas que se expenden en los mercados con el fin de brindar información de la calidad de los lápices labiales que por tener un costo menor son de más fácil accesibilidad.

## XI

## CONCLUSIONES

- Después de realizar los ensayos correspondientes para evaluar la calidad microbiológica de los lápices labiales comercializados en el mercado de Salamanca de Monterrico, se concluye que solo el 4 % de las marcas evaluadas no cumplen con las especificaciones exigidas por la Resolución 1418 de la CAN.
- Se realizó el ensayo de Recuento de Bacterias Mesófilas totales según NTP ISO 21149.2014 obteniendo resultados aceptables, dado que solo el 10 % de estos presentó conteos menores a 5000 UFC/g. De esta manera el 100% de los recuentos de bacterias mesófilas totales estuvieron dentro de la especificación de la normativa nacional.
- No se evidenció crecimiento de *Escherichia coli* ni de microorganismos coliformes.
- Se realizó la prueba de detección de *Pseudomonas aeruginosa* según NTP ISO 21117.2017, concluyendo que el 100% de las muestras tuvo un resultado de “Ausencia”.
- Se ejecutó la prueba de detección de *Staphylococcus aureus* según NTP ISO 21118.2017, concluyendo que el 4% de las muestras examinadas evidenciaron la existencia de este patógeno.
- El ensayo de Recuento Total de Mohos y Levaduras ejecutado según la USP 43, evidenció que el 36% de las muestras tuvieron un recuento fuera de especificación incluyendo una muestra con resultado MNPC (Muy numeroso para contar).
- Si nos rigiéramos a la normativa exigida por la Resolución N° 231-2008 del Consejo de ministros de Integración Económica (COMIECO), el 40 % de las marcas no cumplirían con las especificaciones técnicas.
- Los resultados microbiológicos demuestran, que la falta de exigencia en las normativas vigentes en Perú, pueden poner en riesgo la salud del consumidor, porque, al no considerar el recuento de mohos y levaduras, el 96% de los productos analizados se encuentran aprobados microbiológicamente.

## **XII**

## **RECOMENDACIONES**

- Repetir dichos estudios para detectar la presencia de posibles sustancias nocivas en dichos productos, por ejemplo, para determinar el nivel de arsénico que estos productos puedan contener.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Berkhout, R. (2008). *Candida albicans*.

Bonet R, Garrote A. (2007). *Cosmética Labial*. Offarm; 3:26.

Brooks G. Butel J. Morse, S. (2011). *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*, Editorial El Manual Moderno. México D.F. 25a Edición.

Cáceres, M. (2017). *Establecimiento de la calidad microbiológica del cosmético capilar fabricado a base de compuestos naturales comercializados en Lima Metropolitana* [Tesis de grado]. Perú: Universidad Ricardo Palma

Calderón, J. (2015). *Anatomía de los labios y de la región perioral*. Chimbote- Ancash. Hospital La Caleta.

Carmona, J (2022). *EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE MAQUILLAJE USADO Y SU RELACIÓN CON EL MANEJO Y CUIDADO DE ESTOS PRODUCTOS EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ D.C* [Tesis de grado]Colombia PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

Cisneros, C. et al (2019). *EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL LAPIZ LABIAL LÍQUIDO DE USO COSMÉTICO, POR LÍMITE MICROBIANO COMERCIALIZADOS EN CANASTOS DEL MERCADO ORIENTAL, MANAGUA, NICARAGUA. OCTUBRE – NOVIEMBRE 2018* [Tesis de grado]. Universidad Autónoma de Nicaragua, Leon UNAN.

Carbonell C. et al (2019). *FABRICACIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DEL JABON ARTESANAL CON PEPA DE ACEITUNA*

Flores, M. y Chávez, C. (2017). *Calidad del rubor cosmético comercializado en Emporio Albarracín, Trujillo- 2016*. [Tesis de grado]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica.

FOOD-INFO.NET. (2011). *Staphylococcus aureus*.

Food and Drug Association. (2016). *Secondary File aimed at Suggested Supreme Principal Equal trendy Beautifying Edge Crops then Visibly Useful Makeups*. Rockville.

- García et al (2016). Caracterización de riesgos ambientales y de salud asociados al uso de preservantes tradicionales y alternativos en formulaciones cosméticas\*
- Guerrero González, C. (2014). Diseño de una planta de fabricación de jabón partiendo de aceites vegetales usados. Recuperado el 28 de septiembre de 2018, de <https://n9.cl/hdtme>
- Gudiño, R. (2013). Gestión microbiológica de cremas faciales, a base de productos naturales, comercializadas en centros naturistas de la ciudad de Quito. [Tesis de grado]. Quito: Universidad Central de Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas.
- Jaiminy P. (2014). Ensayos de cosméticos. Requerimientos para productos cosméticos en un mercado global. Documento Técnico. Barcelona. España.
- Jalón, F. (2017). Reacciones Oculares Producidas por Cosméticos
- Laguna, L. y Ricaldi, E. (2017). Determinación de plomo y arsénico en el lápiz labial de distintas marcas que se expenden en Lima Metropolitana. [Tesis de grado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Louise A. (2013). Candidiasis.
- Moreillon P. (2011). “INFECCIÓN POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE A METICILINA (MRSA)”
- Orth, D. S. (1990). Philosophies of conservation. Trendy Director toward Bacteriological Switch fashionable Medications.
- Schiossman Mitchell L. (1986). Engineering courses of tint greasepaints. *Cosm & Toilet* 101 (4): 102.
- Sen, A.S., Patiño Álvarez, B., Vázquez Estévez, C. Marquina Díaz, D. (2009). Diseño docente para la realización de prácticas de control de la calidad microbiológica del producto cosmético y de dermofarmacia. *Reduca (Biología)*. Serie Microbiología. Control Microbiológico de Calidad. 2 (4): 16-34, ISSN: 1989-3620.
- Távora, G et al (2018). DISEÑO DE UN SISTEMA PRODUCTIVO ARTESANAL DE JABÓN AROMATIZADO CON ESENCIA DE NARANJA BASADO EN EL ACEITE DE COCINA EMPLEADO EN EL RESTAURANTE SALOMÉ II DEL CENTRO POBLADO JIBITO, SULLANA

- Tarazona J., Romero R. (2019). Determinación de mercurio y cadmio en producto cosmético, polvo compacto de cinco marcas diferentes comercializadas en el Cercado de Lima. [Tesis de grado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos
- Varela Spuler, C.A. (2013). “Desarrollo y evaluación de productos cosméticos en la compañía cosmética nacional S.A.” Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias. Escuela de Química y Farmacia.
- Vásquez, A. (2015). Evaluación microbiológica de Cosméticos infantiles elaborados en el área centroamericana. San Salvador.
- Vega, B.; Egoavil, H. y Molina, G. (2015). Evaluación de la calidad microbiológica de cremas faciales a base de productos naturales (concha de nácar, baba de caracol y lechuga) comercializados por centros naturistas en Huancayo – 2015. Universidad Peruana de Los Andes. Facultad de Ciencias de la Salud.
- Wilkinson R, Moore J. (1990). Cosmetología de Harry 1990. Ediciones Díaz de Santos.
- Zavala, C. (2015). “ELABORACIÓN DE UN FITOCOSMÉTICO, LÁPIZ LABIAL CON PROPIEDADES HIDRATANTES Y ANTIHERPÉTICAS CON EXTRACTOS DE AMOR SECO (*Bidens pilosa*) Y AROMA DE CAFÉ (*Coffea arabica*)” [Tesis de grado]. ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA.

# Determinación de la calidad microbiológica en productos cosméticos comercializados en el mercado de Salamanca de Monterrico - Ate

## INFORME DE ORIGINALIDAD

18%

INDICE DE SIMILITUD

18%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

6%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://riul.unanleon.edu.ni:8080">riul.unanleon.edu.ni:8080</a>	Fuente de Internet	5%
2	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a>	Fuente de Internet	2%
3	<a href="http://www.gestiopolis.com">www.gestiopolis.com</a>	Fuente de Internet	2%
4	<a href="http://repositorio.unsaac.edu.pe">repositorio.unsaac.edu.pe</a>	Fuente de Internet	1%
5	Submitted to Universidad Ricardo Palma	Trabajo del estudiante	1%
6	<a href="http://www.ccb.org.co">www.ccb.org.co</a>	Fuente de Internet	1%
7	<a href="http://repositorio.urp.edu.pe">repositorio.urp.edu.pe</a>	Fuente de Internet	1%
8	<a href="http://dspace.ups.edu.ec">dspace.ups.edu.ec</a>	Fuente de Internet	1%

9	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	<1 %
10	<a href="http://www.dspace.uce.edu.ec">www.dspace.uce.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1 %
11	<a href="http://pt.scribd.com">pt.scribd.com</a> Fuente de Internet	<1 %
12	<a href="http://www.bbc.com">www.bbc.com</a> Fuente de Internet	<1 %
13	<a href="http://doku.pub">doku.pub</a> Fuente de Internet	<1 %
14	<a href="http://prezi.com">prezi.com</a> Fuente de Internet	<1 %
15	<a href="http://repositorio.unan.edu.ni">repositorio.unan.edu.ni</a> Fuente de Internet	<1 %
16	<a href="http://repositorio.ug.edu.ec">repositorio.ug.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1 %
17	<a href="http://www.msmanuals.com">www.msmanuals.com</a> Fuente de Internet	<1 %
18	<a href="http://ri.iberomx:8080">ri.iberomx:8080</a> Fuente de Internet	<1 %
19	<a href="http://renati.sunedu.gob.pe">renati.sunedu.gob.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
20	Submitted to Universidad Autonoma de Chile	

Trabajo del estudiante

<1 %

21

Submitted to Pontificia Universidad Catolica del Ecuador - PUCE

Trabajo del estudiante

<1 %

22

[dspace.unitru.edu.pe](https://dspace.unitru.edu.pe)

Fuente de Internet

<1 %

23

"Foreign Investment Under the Comprehensive Economic and Trade Agreement (CETA)", Springer Science and Business Media LLC, 2019

Publicación

<1 %

24

[go.gale.com](https://go.gale.com)

Fuente de Internet

<1 %

25

[repository.uamerica.edu.co](https://repository.uamerica.edu.co)

Fuente de Internet

<1 %

26

[scienceandcosmeticinnovation.wordpress.com](https://scienceandcosmeticinnovation.wordpress.com)

Fuente de Internet

<1 %

27

[www.ccj.org.ni](http://www.ccj.org.ni)

Fuente de Internet

<1 %

28

[www.queretaro.gob.mx](http://www.queretaro.gob.mx)

Fuente de Internet

<1 %

29

[www.farmaciatorrent.com](http://www.farmaciatorrent.com)

Fuente de Internet

<1 %

[www.lawyersandsettlements.com](http://www.lawyersandsettlements.com)

30

<1 %

31

Felipe Gamarra P, Viviana Rendón V, Aldemar Chávez R, Leonardo Perez S, Walter Cardona-Maya, Jesús Berdugo G. "Establishing an in vitro production program for buffalo embryos (*Bubalus bubalis*) in Colombia", Revista MVZ Córdoba, 2015

<1 %

Publicación

32

[ciencia.lasalle.edu.co](http://ciencia.lasalle.edu.co)

Fuente de Internet

<1 %

33

[docplayer.es](http://docplayer.es)

Fuente de Internet

<1 %

34

[es.scribd.com](http://es.scribd.com)

Fuente de Internet

<1 %

35

[lajornadamorelos.com](http://lajornadamorelos.com)

Fuente de Internet

<1 %

36

[repositorio.unphu.edu.do](http://repositorio.unphu.edu.do)

Fuente de Internet

<1 %

37

[www.ica.gov.co](http://www.ica.gov.co)

Fuente de Internet

<1 %

38

[www.medellin.edu.co](http://www.medellin.edu.co)

Fuente de Internet

<1 %

39

[www.pintex.com.mx](http://www.pintex.com.mx)

Fuente de Internet

<1 %

Carmen Ortuño Cases. "Aplicación de ultrasonidos de potencia para la mejora de procesos de inactivación con fluidos supercríticos.", Universitat Politecnica de Valencia, 2014

Publicación

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo