

+++  
**NORMA  
VENEZOLANA**

---

**COVENIN  
2130:1998**

**COSMÉTICOS. MÉTODOS  
MICROBIOLÓGICOS**

**(1<sup>ra</sup> Revisión)**



## PROLOGO

La presente norma sustituye totalmente a la Norma Venezolana COVENIN 2130-84, fue elaborada por la Comisión Técnica de Normalización **CTXXVI Farmacia, Cosméticos y Afines**, y aprobada por **FONDONORMA** en la reunión del Consejo Superior N° 98-04 de fecha 1998/05/13.

En la elaboración de esta Norma participaron las siguientes entidades: Cámara Venezolana de la Industria de Productos de Higiene, Cuidado Personal, Perfumería, Cosméticos y Afines CAVEINCA, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (Departamento de Drogas y Cosméticos), Johnson & Johnson de Venezuela, Henkel Venezolana, S.A., Gillette de Venezuela, S.A., Cosméticos Selectos, C.A. COSELCA, Procter & Gamble de Venezuela, Droscosca, C.A., Elca Cosméticos, S.A., Bristol Myers Squibb de Venezuela, S.A., Revlon, C.A., Laboratorios Fisa, C.A., Corinta Schwarzkopf, S.A., Colgate-Palmolive, C.A., Réne Déses de Venezuela.

**NORMA VENEZOLANA  
COSMÉTICOS.  
MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**

**COVENIN  
2130:1998  
(1<sup>ra</sup> Revisión)**

**1 OBJETO**

Esta Norma Venezolana establece los métodos de ensayo para determinar el nivel y tipo de contaminación microbiológica en cosméticos mediante la utilización de una técnica apropiada.

**2 REFERENCIAS NORMATIVAS**

Esta norma es completa.

**3 MEDIOS DE CULTIVO**

- 3.1 Agar Lethen.
- 3.2 Agar Lethen modificado.
- 3.3 Caldo Lethen.
- 3.4 Caldo Lethen modificado.
- 3.5 Agar sabouraud dextrosa, Agar papa dextrosa o Agar extracto de malta.
- 3.6 Agar cetrimide.
- 3.7 Agar Vogel Johnson o Agar Bair Parker.
- 3.8 Agar Mac Conkey.
- 3.9 Agar para anaerobios.
- 3.10 Caldo cerebro corazón.
- 3.11 Agar Levine.
- 3.12 Agar Pseudomona. Medio para detección de Fluoresceína. (Agar F).
- 3.13 Agar Pseudomona. Medio para detección de Piocianina. (Agar P).
- 3.14 Agar Sal Manitol.
- 3.15 Otros (para identificación de bacterias patógenas).

**NOTA:** Los medios de cultivo pueden ser adquiridos como mezclas deshidratadas (comerciales) o preparados a partir de fórmulas, según lo especificado en los textos

**4 REACTIVOS**

- 4.1 Etanol al 80%.
- 4.2 Tween 80.
- 4.3 Clortetraciclina.
- 4.4 Ácido clorhídrico al 1% en Etanol al 80% v/v o cualquier solución similar.
- 4.5 Reactivos para coloración Gram.

**5 APARATOS Y MATERIALES**

- 5.1 Pipetas automáticas
- 5.2 Pipetas estériles graduadas de 1; 2; 5 y 10 ml
- 5.3 Gasas estériles o algodón y papel kraft
- 5.4 Instrumentos estériles: pinzas, tijeras, bisturí, asas de platino, varilla de vidrio curva, espátulas, microespátulas y perlas de vidrio.
- 5.5 Tubos de ensayo.
- 5.6 Tubos de ensayo con tapa de rosca.
- 5.7 Frascos de dilución de 100 ml de capacidad, con tapa a rosca.
- 5.8 Placas de Petri estériles de 15 mm x 100.
- 5.9 Gradilla.
- 5.10 Agitador magnético.
- 5.11 Incubadora a 30 +/- 2 °C y a 35 +/- 2 °C.
- 5.12 Horno mínimo 160 °C.
- 5.13 Sobres generadores de atmósfera anaeróbica, cintas indicadoras de anaerobios y jarra para anaerobios (jarra Gaspak).
- 5.14 Contador de colonias.
- 5.15 Autoclave.
- 5.16 Mechero.

- 5.17 Balanza con una apreciación de 0,01 g.
- 5.18 Plancha de calentamiento con agitación.
- 5.19 Baño de María.
- 5.20 Microscopio.
- 5.21 Nevera.
- 5.22 Campana de flujo laminar con filtro HEPA.
- 5.23 Microondas (Opcional).

## 6 MANEJO DE LAS MUESTRAS

A continuación se dan las guías en el manejo de las muestras para el análisis microbiológico de cosméticos.

- 6.1 Las muestras se deben analizar tan pronto como sea posible después de obtenerlas. Si es necesario almacenarlas, se debe hacer a temperatura ambiente (Máximo 24 horas) y no se deben incubar, refrigerar o congelar antes o después del análisis.
- 6.2 Se deben inspeccionar cuidadosamente las muestras antes de abrirlas para detectar cualquier irregularidad en el recipiente.
- 6.3 Se debe desinfectar la superficie del recipiente que contiene la muestra antes de abrirla con ácido clorhídrico al 1% en Etanol al 80% v/v o cualquier solución similar.
- 6.4 Se debe usar una porción representativa del contenido para el análisis microbiológico. Si es posible, se deben pesar  $10 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  de muestra para obtener una dilución de  $10^{-1}$ . Para productos cuyo contenido sea menor de 10 g se recomienda analizar el contenido completo, pesado exactamente.
- 6.5 Si solamente se tiene una muestra y se le van a realizar varios análisis, por ejemplo: microbiológico, toxicológico y químico, la primera submuestra tomada debe ser la correspondiente para el examen microbiológico.
- 6.6 En el caso de aquellos productos que contengan talco en su composición se recomienda dejar transcurrir 24 horas después de la última manipulación antes del análisis.

## 7 PREPARACIÓN PRELIMINAR DE LA MUESTRA

**7.1 Formas cosméticas miscibles en medio acuoso:** No requiere una preparación especial, añadir la muestra

(según se especifica en el punto 6.4) directamente al caldo de dilución (Caldo Letheen modificado).

**7.2 Formas cosméticas no miscibles en medio acuoso:** Añadir al frasco de dilución la muestra (según se especifica en el punto 6.4) previamente mezclados con la misma cantidad de Tween 80 y agregar caldo de dilución y se mezcla hasta total homogenización.

## 8 MÉTODOS DE ENSAYO

### 8.1 Recuento de aerobios mesófilos

#### 8.1.1 Procedimiento

**8.1.1.1** Preparar y numerar por duplicado placas de Petri para las diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ .

**8.1.1.2** Hacer las diluciones añadiendo 5 ó 10 g (ml) de la preparación cosmética en 45 ó 90 ml respectivamente en caldo de dilución (Caldo Letheen modificado) obteniéndose una dilución 1:10. Diluir las muestras decimalmente hasta obtener una serie de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ .

**8.1.1.3** Mezclar bien las preparaciones en los frascos de dilución y transferir con una pipeta 1 ml de cada dilución a las placas de Petri, por duplicado.

**8.1.1.4** Agregar aproximadamente de 15 a 20 ml de agar para la enumeración (Agar Letheen modificado) previamente fundido y enfriado a  $45^{\circ}\text{C}$ . Mezclar por rotación cada placa para dispersar homogéneamente la muestra.

**8.1.1.5** Se deja solidificar el agar, se invierten y se incuban las placas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas.

**8.1.1.6** Contar todas las colonias de las placas que contienen de 25-250 colonias y anotar los resultados por dilución. Si las placas no contienen de 25-250 colonias, anotar la dilución y el número de colonias encontradas.

#### 8.1.2 Cálculo y expresión de los resultados

Promediar el recuento obtenido de las placas de la misma dilución, multiplicar por el factor apropiado y reportar el resultado como ufc de aerobios mesófilos/g (ml) de muestra. Si el número de colonias es inferior a 25 multiplicar por el factor de dilución el promedio del número de colonias de ambas placas y reportar como "estimado" de ufc de aerobios mesófilos/g (ml) de muestra.

#### 8.1.3 Informe

El informe debe contener lo siguiente:

##### 8.1.3.1 Fecha de realización del ensayo

#### 8.1.3.2 Identificación completa de la muestra.

#### 8.1.3.3 Resultado del análisis realizado.

#### 8.1.3.4 Recuento del microorganismo/g (ml) de muestra

#### 8.1.3.5 Número y título de la Norma Venezolana COVENIN consultada.

#### 8.1.3.6 Nombre del analista.

#### 8.1.3.7 Observaciones.

### 8.2 Recuento de Mohos y levaduras

#### 8.2.1 Preparación

Preparar y enumerar por duplicado placas de Petri, que contengan agar sabouraud dextrosa, agar extracto de malta o agar papa dextrosa con 40 ppm de clortetraciclina (o sustancia de función equivalente) para diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ .

#### 8.2.2 Procedimiento

Hacer diluciones en serie de las muestras añadiendo 5 ó 10 g (ml) de preparación cosmética en 45 ó 90 ml respectivamente de caldo Lethen modificado obteniéndose una dilución 1:10. Diluir las muestras decimalmente hasta obtener una serie de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$ .

##### 8.2.2.1 Método de siembra sobre superficie

**8.2.2.1.1** Mezclar bien las preparaciones en los frascos de dilución y transferir 1 ml de cada una de las diluciones a las placas del agar respectivo por duplicado. Extender el inóculo sobre la superficie del medio con una varilla de vidrio curva estéril.

**8.2.2.1.2** Una vez absorbido el inóculo por la superficie de las placas incubar sin invertir las placas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 5 a 7 días.

##### 8.2.2.2 Método de siembra en profundidad

**8.2.2.2.1** Colocar 1 ml de cada dilución en cada una de las dos placas de Petri estériles y agregar aproximadamente 15 a 20 ml de agar para enumeración de mohos y levaduras, previamente fundido y enfriado a una temperatura de  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , al cual se le adiciona 40 ppm de clortetraciclina. Mezclar por rotación cada placa para distribuir homogéneamente la muestra. Incubar a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y por un periodo de 5 a 7 días.

**8.2.2.2.2** Contar las colonias de ambas placas.

### 8.2.3 Cálculo y expresión de los resultados

Promediar el recuento obtenido en ambas placas y reportar como colonias de mohos y levaduras/g (ml) de muestra.

#### 8.2.4 Informe

Véase punto 8.1.3

### 8.3 Recuento de bacterias anaerobias (solo para talcos y polvos)

#### 8.3.1 Procedimiento

**8.3.1.1** Preparar y enumerar por duplicado las placas de Petri con agar anaerobio o agar sangre (5% de sangre de carnero) para las diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ .

**8.3.1.2** Transferir por duplicado 0,1 ml de cada dilución de la muestra a placas con agar anaerobio o a placas con agar sangre previamente secadas.

**8.3.1.3** Distribuir la dilución en la superficie del agar con ayuda de una varilla curva de vidrio estéril.

**8.3.1.4** Una vez absorbido el inóculo por la superficie de las placas, invertir e incubar (véase anexo A).

**8.3.1.5** Contar todas las colonias de las placas que contienen de 25-250 colonias y anotar los resultados.

#### 8.3.2 Cálculo y expresión de los resultados

Promediar el recuento obtenido de ambas placas por duplicado y reportar como ufc de bacterias anaerobias/g (ml) de muestra.

#### 8.3.4 Informe

Véase punto 8.1.3.

### 8.4 Investigación de patógenos

#### 8.4.1 Enriquecimiento y Aislamiento

**8.4.1.1** Incubar todas las botellas de dilución con caldo Lethen modificado a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  entre 2 y 7 días. Repicar en el agar selectivo (Agar Mac Conkey, Vogel Jonhson y Agar Cetrimide). Incubar a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 48 horas.

**8.4.1.2** Observar todas las placas y seleccionar las colonias morfológicamente diferentes.

**8.4.1.3** Aislar en agar nutritivo y se realiza coloración Gram de cada una de ellas.

**8.4.2** Identificar los patógenos mediante pruebas bioquímicas.(Véase anexo B).

## **BIBLIOGRAFÍA**

AOAC Internacional. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 7<sup>TH</sup>. 1992.

USP 23. United States Pharmacopea.

**Participaron en la elaboración de la primera publicación de esta norma:** Aguiar, Carmen; Ardilla, Ivette C; Burgos, Yajaira; **Bruni**, Wilma; Chamate,

Yumey; Dautant, Gloria; Del Pino, Marieva; Díaz de F., Carmen; Díaz, María Albertina; Gripa, Gheissa; Hernández, Cynthia; Huerta, Fernando; Levy, Mara de; Lupi, Bertha S. de; Marin, Wolstano; Marquez, Diana; Mitre, Laura; Montbrun, Zulay; Montilla, Andrés; Montserrat, María del Carmen; Osorio, Edy Magaly; Parra, Julio Cesar; Puglisi, Giussepina; Ramírez, Mery; Rivers, Alexis Antonio; Romero, Carlos; Santos, Lourdes; Valera de Cabrera, Zorahida; Valerio, Lisbeth.

**Participaron en la primera revisión de esta norma:** Alvarez, Morella; Burgos, Maritza; Bruni, Wilma; Cámara, Rosa; Chamate, Yumey; Delgado, Pedro; Fuentes, Cruz; Freire, María T; Gil, Beatriz; Guzmán, Milena; Peña, Henry; Pérez, Julio; Puente, Mirta; Vanega, Beatriz; Valerio, Lisbeth; Julie Velázquez.



**ANEXO A**  
**(Informativo)**

**Tabla A.1: Condiciones de atmósfera, tiempo y temperatura para microorganismos anaerobios**

| Tipo de anaerobio         | Medios         | Condiciones de atmósfera                                      | Temperatura °C | Tiempo (Horas) |
|---------------------------|----------------|---------------------------------------------------------------|----------------|----------------|
| Anaerobios estrictos      | Agar anaerobio | Jarra Gaspak (anaerobiosis)                                   | 37             | 48             |
| Anaerobios aerotolerantes | Agar sangre    | Incubar 5% - 10% de CO <sub>2</sub> o envase cerrado con vela | 37             | 48             |

**ANEXO B**  
**(Informativo)**

**CARACTERÍSTICAS DE PATÓGENOS**

**Tabla B.1:** Características morfológicas de *Staphylococcus aureus* sobre medios selectivos.

| Medio Selectivo    | Características Morfológicas de la Colonia             | Tinción Gram              |
|--------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------|
| Agar Vogel Johnson | Colonias negras con halo amarillo                      | Coco positivo (En Racimo) |
| Agar Sal-Manitol   | Colonias amarillas rodeadas por zonas amarillas        | Coco positivo (En Racimo) |
| Agar Baird Parker  | Colonias negras brillantes con halo claro, de 2 a 5 mm | Coco positivo (En Racimo) |

**Tabla B.2:** Características morfológicas de *Pseudomonas aeruginosa* sobre medios selectivos y diagnóstico.

| Medio Selectivo                                                 | Características Morfológicas de la Colonia      | Fluorescencia en Luz Ultravioleta | Tinción Gram    |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| Agar Cetrimide                                                  | Colonias generalmente verdosa                   | Verdosa                           | Bacilo negativo |
| Agar Pseudomona. Medio para Detección de Fluoresceína. (Agar F) | Colonias generalmente de incolora a amarillenta | Amarillenta                       | Bacilo negativo |
| Agar Pseudomona. Medio para Detección de Piocianina. (Agar P)   | Generalmente verdosa                            | Azul                              | Bacilo negativo |

**Tabla B.3:** Características morfológicas de *Escherichia coli* sobre medios selectivos.

| Medio Selectivo | Características Morfológicas de la Colonia                    | Tinción Gram                  |
|-----------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Agar Levine     | Colonias verde metálico                                       | Bacilo negativo (Coco-Bacilo) |
| Agar Mac Conkey | Colonias Rojo ladrillo pueden tener un halo bilis precipitado | Bacilo negativo (Coco-Bacilo) |

**COVENIN**  
**2130:1998**

**CATEGORÍA**  
**B**

---

**FONDONORMA**  
**Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12**  
**Telf. 575.41.11 Fax: 574.13.12**  
**CARACAS**

**publicación de:**



**FONDONORMA**

**I.C.S: 71.100.70**

**ISBN: 980-06-2044-3**

**RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS**

**Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.**

---

**Descriptores: Cosméticos, método de ensayo, microbiología.**