UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DTO. DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
CÁTEDRA DEL COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN
"Dr. José Rafael Luna"
UNIDAD CURRICULAR: TRABAJO DE GRADO II

GÉNERO *Staphylococcus* RELACIONADO CON LA PRODUCCIÓN DE BIOFILM EN INSTRUMENTOS APLICADORES DE MAQUILLAJE

Trabajo presentado como requisito para optar al grado de Licenciado en Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

Autoras:

Geoveslit Carolina González Uzcátegui

CI: 23777605

María de los Ángeles Zambrano Solano

CI: 24612479

Tutor:

Prof. Evelyn Alviarez

Mérida, Noviembre de 2022

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DTO. DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
CÁTEDRA DEL COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN
"Dr. José Rafael Luna"
UNIDAD CURRICULAR: TRABAJO DE GRADO II

www.bdigital.ula.ve

GÉNERO *Staphylococcus* RELACIONADO CON LA PRODUCCIÓN DE BIOFILM EN INSTRUMENTOS APLICADORES DE MAQUILLAJE

Trabajo presentado como requisito para optar al grado de Licenciado en Bioanálisis

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso por permitirnos llegar hasta donde hoy nos encontramos, llenándonos de mucha salud y sabiduría, haciéndonos entender que todo es perfecto dentro de sus tiempos y momentos, ya que su gracia no nos lleva a donde su Voluntad no lo permita.

A nuestra querida profesora, tutora y guía durante toda esta investigación; Evelyn Alviarez, por enseñarnos con tanta paciencia; su vocación y dedicación son ejemplo de la excelencia que queremos alcanzar. Gracias por confiar en nosotras y por todos los conocimientos aportados.

A nuestros Padres: Giovanny y Lisbeth, por todo ese amor que me dan y su apoyo incondicional. Este logro es también gracias a uds. Los Amo.

A nuestros Padres: Julia y Virgilio, por su amor, apoyo incondicional, ejemplo de vida y por ser el pilar que me ha sostenido a lo largo de este camino. Sin uds no sería quien hoy soy. Los Amo.

www.bdigital.ula.ve

A mis hermanos: Liseth y Josue, por su cariño y comprensión, son muy importantes para mí. Los quiero.

A mi hermano: Edgar, por ser un gran ejemplo a seguir, por apoyarme y demostrarme que las metas que me proponga las puedo lograr. Te amo

A Toda nuestra Familia (abuelos, tíos, primos, ahijados) por estar y acompañarnos en cada momento, son parte también de este logro, Los Queremos.

A mis amigos: Marlyn y Héctor, su compañía, verdadera amistad y apoyo a lo largo de este camino representa parte importante de mi vida, gracias por estar.

A mis amigos: Rosmary, Albany y Yanderson; por su apoyo, cariño y comprensión, han sido más que amigos, Familia.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

A Todos nuestros amigos; y amigos que la universidad nos regala, porque en distintas partes de nuestro camino han formado parte de este proceso y han sido importantes para llegar a donde hoy nos encontramos.

A Hugo, gracias por tu apoyo, amor y comprensión.

A Josmar, gracias por tu apoyo, amor y comprensión.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darnos sabiduría y paciencia, por guiarnos y fortalecernos en cada momento para no desfallecer y luchar por esta meta que anhelamos alcanzar.

A Nuestra Profesora, tutora, madrina y amiga: Evelyn, por su apoyo incondicional y demostrar que la educación va más allá del aula de clase.

A Nuestros Padres, por ser nuestro principal apoyo y acompañarnos siempre en el camino, por creer en nosotros darnos siempre lo mejor.

A Nuestras Familias y Amigos, por acompañarnos a alcanzar esta meta, por cada palabra, gesto o contribución que nos ayudó a continuar en este camino.

A las estéticas y maquilladoras que laboran en ellas, por su colaboración y disposición para la realización de esta investigación.

www.bdigital.ula.ve

A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Escuela de Bioanálisis por ser Pilar y nuestro segundo hogar durante toda nuestra formación académica. Y al laboratorio de microbiología Roberto Gabaldón, por abrirnos sus puertas y permitirnos llevar a cabo esta investigación

A la ilustre Universidad de los Andes por mantenerse en pie en medio de tantas dificultades y aplicar siempre a la excelencia.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	**x**
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPITULO I. EL PROBLEMA	5
Planteamiento del problema	5
Justificación de la Investigación	7
Objetivos de la Investigación	9
Objetivo General	9
Objetivos Específicos	9
Alcances y Limitaciones	10
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	11
Trabajos Previos	11
Antecedentes Históricos	14
Bases Teóricas	15
Aproximación teórica sobre las nociones del género Staphylococcus	15

www.bdigital.ula.ve

Pág.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Pág.

Aproximación teórica sobre la producción de biofilm como factor de virulencia 15

Aproximación teórica sobre la clasificación de los principales instrumentos aplicadores de maquillaje 16

Género Staphylococcus 17

Taxonomía del género Staphylococcus 18

Factores de virulencia del género Staphylococcus 18

Patogenia del género Staphylococcus en la piel 19

Entidades clínicas producidas por el género Staphylococcus 20

Medios de aislamiento del género Staphylococcus 20

Identificación del género Staphylococcus 21

Biofilm 21

Formación del biofilm 22

El maquillaje 25

Utensilios aplicadores de maquillaje 25

Definición de términos 27

Microbiología 27

Cosmetología 28

Estética 28

Cultivo primario 28

Microorganismos aerobios mesófilos 28

www.bdigital.ula.ve

Pág.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Pág.

Género *Pseudomonas* sp. 29

Operacionalización de las variables 30

Hipótesis 33

Hipótesis alternativa (Ha) 33

Hipótesis nula (Ho) 33

CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO 34

Tipo de Investigación 34

Diseño de Investigación 34

Población y muestra 35

Unidad de investigación 35

Selección del tamaño muestral 35

Sistema de Variables 35

Instrumento de Recolección de Datos 36

Procedimiento de la Investigación 36

Recolección y transporte de la muestra 36

Detección de Microorganismos aerobios mesófilos 36

Cultivos primarios 37

Identificación de Pseudomonas sp. 37

Examen directo. Tinción de Gram 37

Realización de prueba clave: catalasa 37

Pág.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Pág.

Identificación por prueba bioquímica: coagulasa 38

Prueba para determinar presencia de biofilm 38

Diseño de análisis 40

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 41

Resultados 41

Discusión 48

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 51

Conclusiones 51

Recomendaciones 53

BIBLIOHEMEROGRAFÍAS 54

Anexos 58

Pág.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Operacionalización de la variable dependiente: Género *Staphylococcus* 31

Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente: Biofilm 32

Tabla 3. Instrumentos aplicadores de maquillaje analizados 41

Tabla 4. Límites de microorganismos aerobios mesófilos 43

Tabla 5. Identificación de *Pseudomonas* sp. 43

Tabla 6. Resultados de la tinción de Gram 43

Tabla 7. Resultados de la fermentación del Manitol 44

Tabla 8. Resultados del crecimiento en Manitol 44

Tabla 9. Resultados de Catalasa 45

Tabla 10. Resultados de Coagulasa 45

Tabla 11. Cocos Gram positivos identificados 45

Tabla 12. Producción de biofilm 46

Tabla 13. Relación de bacterias identificadas con la producción de biofilm 47

Pág.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Pág.

Esquema 1. Esquematización del procedimiento de la investigación 39

Pág.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Instrumentos aplicadores de maquillaje analizados 42

Figura 2. Cocos Gram Positivos identificados 46

Figura 3. Relación de Bacterias identificadas con la producción de biofilm 47

Pág.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DTO. DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
CÁTEDRA DEL COMPONENTE DE INVESTIGACIÓ
"Dr. José Rafael Luna"
UNIDAD CURRICULAR: TRABAJO DE GRADO I

GÉNERO *Staphylococcus* RELACIONADO CON LA PRODUCCIÓN DE BIOFILM EN INSTRUMENTOS APLICADORES DE MAQUILLAJE

Trabajo de Grado para optar por el título de Licenciada en Bioanálisis

Autoras:
Geoveslit Carolina González Uzcátegui CI: 23777605
María de los Ángeles Zambrano Solano CI: 24612479
Tutor:
Prof. Evelyn Alviarez

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 µm, agrupados como células únicas formando racimos de uvas. Entre los factores de virulencia de este género bacteriano esta la formación de biopelícula o biofilm la cual se define como comunidades microbianas complejas que contienen bacterias y hongos, su función es proteger a los microorganismos de las amenazas externas. Los microorganismos sintetizan y secretan una matriz de protección que adhiere firmemente la biopelícula a una superficie biótica o abiótica. El objetivo de esta investigación fue confirmar la relación entre el género *Staphylococcus* y la producción de biofilm en instrumentos aplicadores de maquillaje de las principales estéticas de la ciudad de Mérida de Abril a Junio del 2022. El diseño fue de campo, contemporáneo, transeccional y multivariable. El procedimiento fue dividido en una serie de pasos: recolección y transporte de la muestra, detección de microorganismos aerobios mesófilos, cultivo primario, examen directo, prueba clave, prueba bioquímica, prueba del biofilm. Los resultados de esta investigación determinaron la presencia de 16 cepas de *Staphylococcus aureus* y 8 cepas de *Staphylococcus* sp. De las 16 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas, 2 no producían biofilm y 14 si producían biofilm. Por su parte, de 8 cepas de *Staphylococcus* sp. aisladas, 5 no producían biofilm y 3 si producían biofilm.

Palabras clave: *Staphylococcus*, biofilm, instrumentos aplicadores de maquillaje, cosmética, estéticas, aerobios mesófilos.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

INTRODUCCIÓN

La organización mundial de la salud (OMS) define a las bacterias como microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria, muchas de las cuales son saprófitas, otras son beneficiosas y el hombre las utiliza para la producción de sustancias en su beneficio (yogur, antibióticos) pero existe un grupo de ellas que causan enfermedades y se las denomina bacterias patógenas. Dentro de esta gran variedad de microorganismos se encuentran los de la familia *Staphylococcaceae* que comprende cocos Gram positivos, no exigentes, catalasa positivos, con agrupación en racimos, aerobios o anaerobios facultativos. De los géneros que la integran *Staphylococcus*, es el de importancia médica. Así bien, dentro del género *Staphylococcus* se encuentran más de 40 especies y es *Staphylococcus aureus* quien tiene mayor importancia.

Por consiguiente, es relevante tener conocimiento de una característica importante del género *Staphylococcus* y es la producción de biofilm; descritos por primera vez en el siglo XVI por Antonie Van Leeuwenhoek, a consecuencia de haber examinado la placa de sus propios dientes. El biofilm se define como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. El crecimiento en biofilms representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. Estudios realizados utilizando microscopía especializada han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm.

Las razones por las cuales se realizó esta investigación están sustentadas en estudios como el de Carmona (2022) quien evaluó la calidad microbiológica del maquillaje usado y fue relacionado con el uso y cuidado de estos productos en la ciudad de Bogotá D.C; obtuvo como resultado que la presencia de *Staphylococcus* sp., excedió los limites microbianos permitidos. De igual forma estudios como el de Cáceres (2018) quien

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

determinó de la calidad microbiológica de cosméticos capilares y obtuvo como resultado que en el 58% de las muestras analizadas se determinó la presencia de Patógenos o el crecimiento de alguna bacteria asociada a estos. El 17% de las muestras analizadas tuvieron presencia de *S. aureus*, el 4% de *P. aeruginosa* y el 2% de *E. coli*. Asimismo, Trujillo (2017) llevó a cabo un trabajo de investigación denominado: Biofilms Microbianos. Tomando en cuenta la importancia de las biopelículas como fuente de infecciones; en este estudio, los datos estimados reflejan que las enfermedades infecciosas suponen la segunda causa de mortalidad debido en su mayoría al establecimiento de estas estructuras.

El procedimiento por medio del cual se llevó a cabo esta investigación se subdivide en una serie de pasos que consistió inicialmente en hacer un barrido en las principales estéticas de la ciudad de Mérida tomando muestra de los instrumentos aplicadores de maquillaje con la técnica de hisopado y siendo transportadas en medios Stuart y caldo enriquecido Letheen, luego fueron procesadas en el laboratorio de Bacteriología Clínica Roberto Gabaldón en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, llevando a cabo los procedimientos reglamentarios para tratar las muestras provenientes del medio cosmético o estético. En comienzo de acuerdo a la Norma COVENIN 1104:1996 se realizó el recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos, seguidamente se dio inicio a las técnicas de diagnóstico microbiológico en cosmética con la norma ISO 22718:2016; fueron sembradas en los medios de cultivo Agar BHI y Agar Manitol Salado de la casa comercial BBL, para poder hacer el aislamiento del género *Staphylococcu*s. Continuando se efectuaron las pruebas catalasa y coagulasa para diferenciar las especies y finalmente, se ejecutó la técnica: Método de tubo: Descrito por Christensen et al.1982, Método cualitativo en la detección de biofilm.

www.bdigital.ula.ve

Esta Tesis está sistematizada bajo las normas de la Academia Americana de Psicología (APA) y se encuentra conformado por 5 capítulos, el primero titulado: El Problema, subtitulado de la siguiente manera: Planteamiento del problema,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Justificación e importancia de la investigación, Objetivos, Alcances y limitaciones. El segundo capítulo titulado: Marco teórico, con varios subtítulos: Trabajos previos, Antecedentes históricos, Bases teóricas, definición de términos, Operacionalización de variables, Sistema de hipótesis. El tercer capítulo titulado: Marco metodológico, ordenado con los siguientes subtítulos: Tipo de investigación, Diseño de investigación, Población y muestra, Sistema de variables, Procedimiento de la investigación, Diseño de análisis. El Cuarto capítulo: Resultados y discusión, el cual engloba ambos elementos y finalmente el quinto capítulo: Conclusiones y Recomendaciones.

El objetivo de esta investigación fue confirmar la relación entre el género *Staphylococcus* y la producción de biofilm en instrumentos aplicadores de maquillaje en las principales estéticas de la ciudad de Mérida de Abril a Junio de 2022.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

Los cocos Gram positivos son un grupo heterogéneo de bacterias. Las características que tienen en común son su forma esférica, su reacción a la tinción de Gram y la ausencia de endosporas. La presencia o ausencia de actividad catalasa es una prueba sencilla que se utiliza para subdividirlas en varios géneros. La mayor parte de los estafilococos tiene un diámetro de entre 0,5 y 1,5 µm, son inmóviles y capaces de crecer en una variedad de condiciones aeróbica y anaeróbicamente en presencia de una elevada concentración de sal y a temperaturas de 18-40°C. Estas bacterias están presentes en la piel y las mucosas del ser humano. Murray et al. (2014).

www.bdigital.ula.ve

En este mismo orden de ideas asociado al género *Staphylococcus* está la producción de biofilm. El biofilm; se trata de comunidades bacterianas que pueden estar conformadas por una única especie o por múltiples especies microbianas englobadas en una matriz de exopolisacáridos producida por las bacterias y adheridas a una superficie viva o inerte. En la naturaleza es la forma de crecimiento más frecuente de las bacterias e incluso de la mayoría de los patógenos. Este tipo de crecimiento permite la supervivencia de las bacterias en un medio hostil y en algunos casos es el origen de varios procesos infecciosos. Ibarguren (2019).

La investigación está respaldada por medio de las aproximaciones teóricas, clasificadas en: Aproximación teórica sobre las nociones del género *Staphylococcus*,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

aproximación teórica sobre la producción de biofilm como factor de virulencia y aproximación teórica sobre la clasificación de los principales instrumentos aplicadores de maquillaje. Las cuales explican los conocimientos sobre el género *Staphylococcus* para relacionarlo con la producción de biofilm muy comúnmente encontrado en la industria de la cosmética y que en esta ocasión será investigado específicamente en los instrumentos aplicadores de maquillaje; por tanto, lo que allí se describe ofrece un sustento para lo que fue la realización la de presente investigación

En los últimos 5 años, el control microbiológico en la industria cosmética ha jugado un papel importante que ha sido estudiado con el fin de conocer y evitar la propagación de enfermedades contagiadas a través de esta indumentaria estética. Uno de estos estudios es el de Carmona (2022) quien realizó una evaluación de la calidad microbiológica del maquillaje usado y lo relacionó con el uso y cuidado de estos productos en la ciudad de Bogotá D.C. Obteniendo que la presencia de *Staphylococcus* sp, excedió los limites microbianos permitidos. De igual forma el estudio de Cáceres (2018) determinó la calidad microbiológica de cosméticos capilares elaborados a base de compuestos naturales, obteniendo como resultado que en el 58% de las muestras analizadas se determinó la presencia de patógenos o el crecimiento de alguna bacteria asociada a estos, aislando principalmente a *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* sp. Y *E. coli*.

www.bdigital.ula.ve

Por su parte un estudio realizado por Trujillo en el 2017 se basa en el conocimiento sobre los Biofilms Microbianos, siendo importante para documentarse y de esta forma poder relacionar el aislamiento de las bacterias del género *Staphylococcus* con la producción de este determinante de patogenicidad.

Por lo anteriormente mencionado, y habiendo comprendido los términos e ideas principales que se refieren al problema de investigación, se enfoca y delimita en torno a éste la siguiente interrogante: ¿Existe relación entre el género *Staphylococcus* y la

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

producción de biofilm en instrumentos aplicadores de maquillaje de las principales estéticas de la ciudad de Mérida de Abril a Junio de 2022?

Justificación e importancia de la investigación

La justificación debe responder a los por qué o razones de la investigación. Específicamente, estas razones pueden ser categorizadas como necesidades, curiosidades y preocupaciones, motivaciones, intereses, valores, potencialidades, oportunidades, tendencias, contradicciones. Hurtado (2012). Los autores de esta investigación identificaron necesidades tales como: en la actualidad, el género *Staphylococcus* comprende 45 especies y 24 subespecies, muchas de las cuales se encuentran en el ser humano, Murray et al. (2014), es importante señalar que algunas de estas especies son patógenas cuando existe predisposición e inmunosupresión en el huésped o en presencia de cuerpos extraños. Cervantes et al. (2014). De igual forma es necesario destacar la relación que puede existir entre el aislamiento de este género y la producción de biofilm como lo propuso Ibarguren, en el 2019, ya que esta propiedad les confiere protección frente a los mecanismos de defensa del hospedador y los protege de la acción de los agentes antimicrobianos.

www.bdigital.ula.ve

Al considerar los por qué anteriores, los autores de esta investigación también encontraron razones con categoría de potencialidad. El biofilm bacteriano empieza a formarse cuando alguna célula individual se une inicialmente a una superficie. La capacidad de la célula para realizar adherencia inicial depende de factores ambientales como la temperatura, sustancias orgánicas y el pH, entre otros, y de factores genéticos que codifican las funciones motrices, la sensibilidad ambiental, las adhesinas y otras proteínas. Sin embargo, la combinación de los factores que influyen en el desarrollo del biofilm dependen en principio de la especie, algunas características son comunes a la mayoría de bacterias estudiadas hasta ahora. Ibarguren (2019)

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias. Lasa et al. (2005)

Así bien, esta investigación se presenta focalizada en el aislamiento de microorganismos específicamente bacterias del género *Staphylococcus* en instrumentos aplicadores de maquillaje y a partir de ello confirmar la relación con la producción de biofilm, tomando en cuenta que por medio de la formación de la biopelícula se facilita la sobrevivencia del microorganismo en la superficie conllevando a la propagación y transmisión del mismo, pudiendo ser causante de infecciones oportunistas al desarrollarse bajo condiciones que le permitan ser el agente causal de una patología.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Confirmar la relación entre el género *Staphylococcus* y la producción de biofilm en instrumentos aplicadores de maquillaje de las principales estéticas de la ciudad de Mérida de Abril a Junio de 2022.

Objetivos específicos

- Evaluar la calidad microbiológica mediante la determinación de aerobios mesófilos (Normas COVENIN) en los instrumentos aplicadores de maquillaje.
- Comprobar la presencia del género *Staphylococcus* como marcador de calidad microbiológica en los instrumentos aplicadores de maquillaje.
- Evidenciar la presencia del género *Pseudomonas* como marcador de calidad microbiológica en los instrumentos aplicadores de maquillaje.
- Verificar la producción de biofilm en cepas aisladas pertenecientes al género *Staphylococcus* aisladas de los instrumentos aplicadores de maquillaje.
- Demostrar cuál especie perteneciente al género *Staphylococcus* productores de Biofilm, se aísla con mayor frecuencia de los instrumentos aplicadores de maquillaje.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Los alcances de la investigación están relacionados con la profundidad de lo que se quiere conocer. En tal sentido, el nivel de complejidad en el proceso de conocer de este estudio es de integración, ya que se comparó la frecuencia del género *Staphylococcus* relacionado con la producción de biofilm en instrumentos aplicadores de maquillaje. Hernández et al. (2010). Hurtado (2010). Finalmente, la profundidad de este estudio también consideró la correlación de las variables intervinientes con las variables dependiente e independiente.

El alcance de esta Investigación fue confirmar la relación entre el género *Staphylococcus* y la producción de biofilm en instrumentos aplicadores de maquillaje de las principales estéticas de la ciudad de Mérida de Abril a Junio de 2022.

www.bdigital.ula.ve

Limitaciones de la Investigación

Según Hernández et al. (2010), las limitaciones de una investigación están relacionadas con los recursos teóricos, técnicos y de presupuesto económico. En tal sentido, durante esta investigación se presentaron algunas limitaciones en cuanto a la disponibilidad y adquisición de reactivos y medios de cultivo. Otra de las limitaciones estuvo relacionada con los recursos monetarios debido al conflicto económico del país. Sin embargo, las limitaciones mencionadas no impidieron la realización de la investigación.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos previos

Carmona (2022) realizó un trabajo titulado: Evaluación de la calidad microbiológica del maquillaje usado y su relación con el manejo y cuidado de estos productos en la ciudad de Bogotá D.C. El alcance de la investigación consistió en evaluar la calidad microbiológica del maquillaje usado según la normatividad nacional vigente para límite microbiano y su relación con el manejo y cuidado de estos productos en la ciudad de Bogotá D.C. en el año 2022. Para lograr tal objetivo, se procesaron nueve muestras, tres pestañinas, tres labiales y tres polvos o sombras, de tres formas farmacéuticas diferentes (líquida, sólida y semisólida) de tres personas diferentes; las muestras fueron analizadas según las normas UNE EN ISO para análisis de microorganismos mesófilos aerobios y patógenos como *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y Candida albicans*, además, se realizaron pruebas bioquímicas para identificación de género. Posteriormente se compararon los resultados con el límite microbiano permitido según la Resolución No. 2120 de 2019 "Reglamento Técnico Andino sobre Especificaciones Técnicas Microbiológicas de Productos Cosméticos". Por último, se realizó una encuesta a los individuos que suministraron las muestras de maquillaje, con el fin de conocer el uso, cuidado y almacenamiento de cada uno de ellos con su maquillaje, para poder correlacionar la información con los datos encontrados en el recuento e identificación de microorganismos detectados en las muestras. Se encontró crecimiento de *Bacillus* sp. y *Streptococcus* sp. dentro de límites

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

microbianos permitidos según la reglamentación nacional, principalmente en las muestras de pestañina y labial, sin embargo, dos muestras de pestañina analizadas no cumplen con el límite microbiano establecido en la Resolución 2120 de 2019. El análisis de la presencia de *Staphylococcus* sp, excedió los limites microbianos permitidos. En cuanto a los resultados obtenidos en el formulario "Cuidado del maquillaje" se identificaron factores que pueden influir en la contaminación cruzada entre productos, como compartir el maquillaje y mezclar producto sobre producto; también, se observó la alta prevalencia en los individuos de no leer las instrucciones del producto y no estar atentos a las fechas de vencimiento, lo que podría generar riesgos en la salud del consumidor.

Cáceres (2018) realizó un trabajo titulado: Determinación de la calidad microbiológica de cosméticos capilares elaborados a base de compuestos naturales comercializados en Lima Metropolitana. El alcance de la investigación consistió en determinar la calidad microbiológica de cosméticos capilares elaborados a base de compuestos naturales comercializados en Lima Metropolitana. Se realizó un estudio observacional descriptivo de corte transversal, Las especificaciones microbiológicas en cosméticos capilares indican un límite máximo de recuento de microorganismos aerobios mesófilos de 5 x 10^3 UFC/g o mL., además los microorganismos patógenos *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* deben estar ausentes en 1 g o mL. En este estudio se analizaron 48 muestras de cosméticos capilares y como resultados se determinó que el 17% de las muestras analizadas obtuvieron resultados fuera de especificación en recuento de mesófilos aerobios. En el 58% de las muestras analizadas se determinó la presencia de Patógenos o el crecimiento de alguna bacteria asociada a estos. El 17% de las muestras analizadas tuvieron presencia de *S. aureus*, el 4% de *P. aeruginosa* y el 2% de *E. coli*. Con respecto a los microorganismos asociados a estas bacterias patógenas, se obtuvo un 15% de muestras con presencia de coliformes, un 2% con la presencia de un microorganismo asociado a *S. aureus* y un 19% que corresponde al crecimiento de bacterias pertenecientes al "Complejo

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Burkholderia cepacia" (CBc). En conclusión, se determinó que los cosméticos capilares elaborados a base de compuestos naturales comercializados en Lima metropolitana no cumplen con las especificaciones microbiológicas emitidas por los entes reguladores. Así bien, este estudio es incluido dentro de los trabajos previos por el hallazgo microbiológico encontrado en el área de cosméticos que implica una gran importancia a nivel de salud pública y de igual forma para la comercialización en esta industria.

Trujillo (2017). Llevó a cabo un trabajo de investigación denominado: Biofilms Microbianos. El cual tuvo como alcance estudiar cómo se forma una biopelícula, sus componentes y como su función afecta a distintos sectores como son la industria, el área clínica, la cosmética, la naturaleza, entre otros. Además, se habla de distintas técnicas desarrolladas actualmente para el estudio y observación de las biopelículas, pudiéndose desarrollar estrategias de prevención que unidas a las técnicas de desinfección y saneamiento vigentes podrían ser la combinación necesaria para erradicarlos. Para ello, se recurre al conocimiento de su estructura, composición, resistencias y proporción de los distintos microorganismos que conforman un determinado biofilm, así como al estudio de las posibles estrategias que provocarían una mejora, tanto de la salud pública como ambiental. Es así como concluye estableciendo que la formación de un biofilm es una estrategia adaptativa que incrementa la capacidad de supervivencia de las bacterias proporcionándoles suministros, escudo protector, transferencia de material genético. Todo ello, provoca que se originen problemas en el área industrial o la medicina, entre los casos más destacados. La importancia de las biopelículas como fuente de infecciones se manifiesta en las estadísticas, donde los datos estimados reflejan que las enfermedades infecciosas suponen la segunda causa de mortalidad debido en su mayoría al establecimiento de estas estructuras.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Antecedentes Históricos

Han transcurrido más de 100 años desde que por primera vez Robert Koch en 1878 fue el primero en describir estafilococos en pus humano y en el año de 1880 Luis Pasteur los cultivó en medio líquido donde se observaron cocos en heridas y en pus procedente de abscesos humanos. Pero hasta 1880, fecha en la que Alexander Ogston pública sus datos donde mostraba la existencia de numerosas infecciones piogénicas causadas por cocos, no se empieza a utilizar el término *Staphylococcus*

El nombre de *Staphylococcus* proviene de la palabra griega Staphyle que significa uva por lo tanto se hace la analogía con un racimo de uvas que es la agrupación observada para esta bacteria en una tinción de Gram. Desde su descubrimiento por el médico Alexander Ogston en 1880, *Staphylococcus aureus* es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y en los animales.

www.bdigital.ula.ve

En 1884, *S. aureus* fue identificado por Rosenbach, como la bacteria causante de infecciones en heridas. Posteriormente en 1928, Alexander Fleming descubre que el hongo *Penicillium* contamina medios de cultivos con cepas de *Staphylococcus aureus*, y observa la inhibición de la bacteria evidenciando de esta manera una nueva sustancia (antibiótico) la penicilina.

Por su parte, las biopelículas o biofilms, fueron descritos por primera vez en el siglo XVI por Antonie Van Leeuwenhoek, a consecuencia de haber examinado la placa de sus propios dientes declarando haber observado unos "animálculos" en un informe de la Royal Society. La teoría general que describe el proceso de biopelícula no se promulgó hasta el año 1978. Dicha teoría se ha transformado y perfeccionado durante los últimos 25 años, entendiendo hoy en día, que la gran mayoría de los microorganismos en la naturaleza se encuentran adheridos a superficies donde crecen formando biopelículas o biofilms.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Antecedentes Teóricos

Bases teóricas

Aproximación teórica sobre las nociones del género Staphylococcus

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm, agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Son bacterias inmóviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. Los estafilococos producen catalasa; característica que se utiliza para diferenciarlos de otros géneros. *S. aureus* es uno de los patógenos más importantes a nivel mundial, ya que es considerada una bacteria oportunista que forma parte de la microbiota humana.

www.bdigital.ula.ve

Los estafilococos conforman un importante grupo de patógenos en el ser humano y originan un amplio espectro de enfermedades sistémicas que pueden poner en peligro la vida, infecciones de la piel, los tejidos blandos, los huesos y el aparato genitourinario e infecciones oportunistas. Murray et al. (2014).

Aproximación teórica sobre la producción de biofilm como factor de virulencia

El biofilm puede desarrollarse en distintos tipos de superficies, gracias a que previamente entra en contacto con la materia orgánica presente en el agua. En la interfase agua/superficie se deposita una capa orgánica, que cambia las propiedades químicas y físicas de la superficie y mejora las posibilidades de fijación de los microorganismos. Mediante un mecanismo de comunicación célula-célula denominada

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

quorum sensing, favorece la regulación y formación de una biopelícula mediante tres pasos: en el primero la bacteria secreta una gran variedad de proteínas de superficie de adhesión celular; en la segunda los microorganismos se organizan en pequeños agregados hasta llegar a formar una matriz extracelular cuyo principal componente son los polisacáridos de adhesión intracelular y por último, la diseminación y colonización del patógeno en nuevas superficies durante los procesos infecciosos. Constanza et al. (2017)

Las bacterias han crecido en biofilms durante millones de años, como parte de una estrategia exitosa para colonizar el planeta y la mayoría de los seres vivos. Los microorganismos del biofilm son muy difíciles de tratar con agentes antimicrobianos y la liberación de bacterias desde el biofilm puede provocar una infección, sobre todo si el paciente esta inmunocomprometido. Lasa et al. (2005).

www.bdigital.ula.ve

Aproximación teórica sobre la clasificación de los principales instrumentos aplicadores de maquillaje.

La industria de la cosmética ha tenido una evolución que ha permitido hoy en día la perfección de diversos productos y técnicas. Para la realización del maquillaje ideal han sido creados utensilios aplicadores de funciones específicas que son comúnmente usados por los profesionales de este sector. Cabe destacar; que esto implica de igual forma, tener en cuenta el conocimiento sobre el cuidado y control de estos instrumentos

La principal clasificación de interés de los utensilios aplicadores de maquillaje es la de brochas, pinceles y esponjas. Así bien, las brochas y pinceles se clasifican de acuerdo al tipo de pelo, longitud, tamaño y función. De igual forma; las esponjas, se clasifican de acuerdo a si son de silicona, esponjas minis, esponjas ergonómicas y clásicas. Trueba (2017). Por consiguiente, la importancia de conocerlos es dado a que

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

estos instrumentos aplicadores de maquillaje encontrados en la industria deben contar con la higiene adecuada, ya que son superficies en las que fácilmente se pueden establecer y desarrollar microorganismos causantes de enfermedades.

Género Staphylococcus

El nombre del género *Staphylococcus* se refiere a que estos cocos Gram positivos se desarrollan en un patrón que recuerda a un racimo de uvas; sin embargo, los microorganismos presentes en muestras clínicas aparecen como células aisladas, en pares o en cadenas cortas., Son inmóviles, no forman esporas, no poseen cápsula y son anaerobias facultativas. La presencia o ausencia de actividad catalasa es una prueba sencilla que se utiliza para subdividirlas en varios géneros. Las catalasas son enzimas que convierten peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso. Es usada para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos. En la actualidad, el género comprende 45 especies y 24 subespecies, muchas de las cuales se encuentran en el ser humano. Algunas de estas especies son patógenas cuando existe predisposición e inmunosupresión en el huésped o en presencia de cuerpos extraños. Murray et al. (2014).

www.bdigital.ula.ve

Cabe destacar que en la actualidad se ha conocido a la especie *Staphylococcus aureus* como un complejo, que posee relevancia clínica por sus divisiones en otras sub especies que le permiten ser indicadores de ciertas enfermedades, haciendo necesaria su diferenciación. Al poseer diversos componentes genéticos que los diferencie uno de otro hace posible también la variaciones en cuanto a factores de patogenicidad que son de interés. Becker et al. (2019)

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Taxonomía del género Staphylococcus

- Dominio: *Bacteria*
- Phylum: *Firmicutes*
- Clase: *Bacilli*
- Orden: *Bacillales*
- Familia: *Staphylococcaceae*
- Género: *Staphylococcus*
- Especie: Más de 40 en humanos.

Factores de Virulencia del género Staphylococcus

www.bdigital.ula.ve

Se clasifican de acuerdo a: factores de virulencia estructurales y factores de virulencia solubles.

Los factores de virulencia estructurales son: La capsula, que inhibe la fagocitosis y facilita la adherencia a cuerpos extraños. El peptidoglicano, otorga estabilidad osmótica; estimula la producción de pirógenos endógenos (actividad de tipo endotoxina); quimio atrayente leucocitario (formación de abscesos). El ácido teicoico y lipoteicoico, median la unión a superficies mucosas a través de la fibronectina, actividad de tipo endotoxina. Membrana citoplasmática, representa una barrera osmótica y allí se localizan las enzimas. Proteína A, inhibe la eliminación mediada por anticuerpos al unirse a los receptores Fc de lgG1, lgG2, lgG4; quimio atrayente leucocitario (Abscesos); anticomplemento.

Los factores de virulencia solubles se clasifican en toxinas y enzimas. Las toxinas son: Citotoxinas α, β, δ, γ leucocidina PV, tóxicas para muchas células, incluyendo leucocitos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos (promueven la destrucción

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

tisular). Toxinas exfoliativas (ETA, ETB), proteasas séricas que rompen los puentes intercelulares del estrato granuloso de la epidermis. (SPEE) Toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), superantígeno, produce la extravasación o la destrucción celular de las células endoteliales. (SST) 8 Enterotoxinas (A-E, G-l), son termoestables, resistentes a enzimas gástricas, estimulan la liberación de mediadores inflamatorios en los mastocitos, aumentando el peristaltismo intestinal y la pérdida de líquidos, así como la aparición de náuseas y vómitos (Enteritis), superantígenos.

Consecuentemente, las enzimas son: Coagulasa, convierte el fibrinógeno en fibrina (infección localizada). Catalasa, cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno (fagocito del metabolismo bacteriano). Hialuronidasa, hidroliza los ácidos hialurónicos en el tejido conectivo, facilitando la diseminación de los estafilococos en los tejidos. Fibrinolisina, disuelve los coágulos de fibrina (diseminación). Lipasas, hidroliza los lípidos (Zonas sebáceas) Nucleasas Hidroliza el ADN. Penicilinasas, hidroliza las penicilinas. Koneman (2008).

www.bdigital.ula.ve

Patogenia del género Staphylococcus en la piel

Inicialmente el *Staphylococcus* ingresa a través de un folículo piloso o glándula sebácea; es decir, por la piel con traumatismo. Procede a la adherencia a fibronectina, colágeno y elastina; esto gracias a las adhesinas como el ácido teicoico. Seguidamente, evade la fagocitosis con la ayuda de la cápsula y proteína A. Continua con la invasión y destrucción tisular favorecida por las enzimas y toxinas. Se da la formación de pus: acumulación de tejido necrótico, neutrófilos y bacterias, estableciéndose así un proceso localizado en piel que puede diseminarse por vía hematógena causando una bacteremia que podría conllevar a una endocarditis o meningitis. Murray et al. (2014).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Entidades clínicas producidas por el género Staphylococcus

El *S. aureus* por medio de procesos invasivos puede ocasionar: infecciones de piel, osteomielitis, neumonía, bacteremia, artritis séptica, mastitis y meningitis. Por un mecanismo toxigénico puede producir una enteritis o el síndrome de piel escaldada. Si se trata de un mecanismo inmunitario conlleva al padecimiento del síndrome del shock tóxico. Por su parte, el *Staphylococcus* sp., por un mecanismo invasivo puede producir: infecciones de piel, osteomielitis, neumonía y bacteremia. Chans (2002).

Medios de aislamiento del género Staphylococcus

www.bdigital.ula.ve

En los medios de cultivo tradicionales la mayoría de las especies crecen después de incubarse durante 18-24 horas, formando colonias de 0.5-1.5 mm de diámetro. Las colonias de *S. aureus* se observan lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, presentan consistencia cremosa y pigmentación que va del amarillo a dorado debido a la producción de carotenoides, la mayoría de las cepas producen β-hemólisis o hemólisis total alrededor de las colonias cuando se cultivan en agar sangre. *S. aureus* se diferencia de las demás especies por producir coagulasa que se manifiesta por su capacidad para coagular el plasma, es resistente al calor, a la desecación y puede crecer en medios con grandes cantidades de NaCl (7.5%). *S. aureus* crece bien en medios de cultivos no selectivos, como el agar sangre, agar chocolate, cerebro corazón infusión agar (BHI, por sus siglas en inglés) y medios líquidos para hemocultivo donde se recupera fácilmente.

Es importante que para este género se use un medio selectivo en muestras que contienen bacterias Gram negativas junto con *S. aureus*. El medio recomendable y usado por la mayoría de los laboratorios es el agar Manitol Salado; por su elevado contenido de sal inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram negativas.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Este medio permite realizar la identificación presuntiva de *S. aureus* por la pigmentación amarilla característica del mismo. Debido a que esta bacteria fermenta el manitol se genera un cambio de color en el medio que vira de rojo pálido a amarillo. Los *Staphylococcus* sp. No fermentan el manitol y crecen en el medio formando colonias pequeñas de color que varía de blanco a rosado. Cervantes et al. (2014).

Identificación del género Staphylococcus

La identificación del género *Staphylococcus* se realiza con el empleo de la tinción de Gram, pruebas bioquímicas como: prueba de la catalasa, fermentación de glucosa, que permite diferenciar al género *Staphylococcus* del género *Micrococcus*, que también se considera una catalasa positiva pero no fermenta la glucosa.

www.bdigital.ula.ve

En continuidad, la prueba de la coagulasa sigue siendo la más utilizada; esta se basa en la capacidad de *S. aureus* para producir la enzima extracelular que coagula el plasma. La detección de la coagulasa permite diferenciar *S. aureus* coagulasa positivo de las demás especies de estafilococos coagulasa negativos. *S. aureus* también puede identificarse a través de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real, utilizando genes específicos de especie. Sin embargo, estas técnicas son caras y laboriosas. Koneman (2008).

Biofilm (Biopelícula)

Las biopelículas son comunidades microbianas complejas que contienen bacterias y hongos, su función es proteger a los microorganismos de las amenazas externas. Los microorganismos sintetizan y secretan una matriz de protección que adhiere firmemente la biopelícula a una superficie biótica o abiótica, pueden consistir en una

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

sola especie bacteriana o fúngica o, más comúnmente, pueden ser polimicrobiana, es decir, contienen muchas especies distintas. Al nivel más básico, una biopelícula puede describirse como un conjunto de bacterias incrustadas en una barrera densa y viscosa de azúcares y proteínas. Phillips (como se citó en Trujillo, 2017).

En el biofilm, los aglomerados de células bacterianas están encerrados en un medio extracelular amorfo el cual consta de un material compuesto de productos bacterianos, tales como ácidos teicoicos, proteínas, polisacáridos, ADN extracelular y productos hospedadores. Para facilitar la adhesión intercelular, los miembros del género *Staphylococcus* producen diversas proteínas y no proteínas adhesinas; las adhesinas proteínicas se agrupan en proteínas covalentemente ancladas en la superficie, también denominadas células (CWA), incluyendo las autolisinas, a su vez las adhesinas no proteínicas incluyen la adhesina intercelular de polisacárido (PIA), también conocida como poli-N-acetilglucosamina, así como los ácidos teicoicos y lipoteicoicos. Por su parte la adhesión a las superficies abióticas está determinada por las propiedades superficiales de las bacterias y los cuerpos extraños, se trata de fuerzas fisicoquímicas tales como interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals y cargas, estas interacciones pueden estar mediadas por las proteínas CWA que están covalentemente unidas al peptidoglicano. Becker et al. (2014).

www.bdigital.ula.ve

Formación del biofilm

En la primera fase ocurre la adhesión reversible a la superficie, los microorganismos normalmente se perciben como seres solitarios que flotan libremente, es decir, en estado planctónico. Sin embargo, en condiciones naturales, la mayoría de microorganismos tiende a adherirse a superficies y finalmente conforman las biopelículas. La adherencia inicial está mediada por una adhesina polisacárida llamada

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

(PS/A) la cual, se trata de un polímero de galactosa-arabinosa de alto peso molecular y otras proteínas de superficie (SSP-1, SSP-2, Bhp). Phillips (como se citó en Trujillo, 2017).

En la segunda fase ocurre la adhesión irreversible a la superficie a medida que las bacterias se multiplican, se adhieren más firmemente y se diferencian, cambiando los patrones de expresión génica en formas que promueven la supervivencia, esto suele ser el resultado de un tipo de comunicación bacteriana conocida como detección de quórum o de (autoinducción). Phillips (como se citó en Trujillo, 2017).

La unión de los microorganismos a una superficie y formación de un biofilm necesita que las bacterias se cercioren que han efectuado contacto, para lograrlo requieren de señales químicas coordinadas que les permitan comunicarse entre ellas. El desarrollo de interacciones célula-a-célula se facilita por la estrecha proximidad existente entre las bacterias biofilm. Esta interrelación, vía mensajeros de pequeñas moléculas, denominada quórum, beneficia a la bacteria al permitirle sentir la presencia de microorganismos vecinos, determinar la densidad de la población existente y responder a eventuales condiciones cambiantes. El proceso quorum funciona debido a que cada bacteria que se une a una superficie produce una molécula señal, de manera tal que mientras más bacterias se unen, se incrementa la concentración local de esta señal. Nazar (2007).

www.bdigital.ula.ve

En la tercera fase se forma una biopelícula o matriz protectora viscosa, una vez bien adheridas, las bacterias comienzan a segregar una matriz circundante conocida como sustancia polimérica extracelular (SPE), se trata de una matriz protectora o “limo”. A partir de ahí, las pequeñas colonias bacterianas empiezan a formar una biopelícula inicial, la composición exacta de la SPE varía según los microorganismos presentes, pero por lo general, consta de polisacáridos, proteínas, glucolípidos y ADN bacteriano, se cree que el ADN bacteriano que liberan las bacterias vivas o muertas proporciona un componente estructural importante para la matriz de la SPE de la biopelícula. Phillips (como se citó en Trujillo, 2017).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Varias proteínas y enzimas secretadas facilitan la adhesión a la herida, de esta manera el biofilm crece y madura en una capa gruesa y estructurada. Un biofilm maduro contiene canales que están llenos de líquido para asegurar la entrada de oxígeno y nutrientes a las células bacterianas localizadas en las capas más profundas de la biopelícula. Becker et al. (2014).

Las biopelículas se forman de manera rápida ya que las bacterias planctónicas se adhieren al cabo de unos minutos, formando microcolonias fuertemente adheridas, en un plazo de 2 a 4 horas desarrollan la SPE inicial y presentan cada vez más resistencia a los antibióticos, antisépticos y desinfectantes, en un plazo de 6 a 12 horas evolucionan en colonias de biopelículas maduras extremadamente resistentes y excretan bacterias planctónicas. Phillips (como se citó en Trujillo, 2017).

Diversos estudios han llegado a la conclusión de que el desarrollo de biofilm por parte de las bacterias se produce inicialmente a través de interacciones célula-superficie, estas interacciones pueden ser mediadas por una serie de factores, incluyendo proteínas de superficie como el polisacárido adhesina capsular (PS/A). Posteriormente estos organismos entran en la llamada "Fase acumulativa" donde ocurren interacciones célula-célula y a su vez la formación de agregados celulares en la superficie. Además del contenido nutricional del medio, otras señales ambientales pueden influir en la formación del biofilm, entre ellas la temperatura, osmolaridad, pH, hierro y oxígeno. O´toole et al. (2000).

www.bdigital.ula.ve

En cuanto a la resistencia bacteriana, las bacterias biofilm presentan una organización estructural que las hace resistentes a los mecanismos de defensa del huésped. Los biofilms, revestidos con SPE y conteniendo múltiples microcolonias bacterianas en su interior, se convierten en estructuras demasiado grandes como para ser fagocitadas, reduciendo la accesibilidad del sistema inmune a las bacterias, cabe destacar que las bacterias biofilms son muy resistentes a los antibióticos, siendo capaces de sobrevivir frente a concentraciones antibióticas miles de veces mayor con respecto a las bacterias planctónicas. Nazar (2007).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

El Maquillaje

Esta práctica es empleada en los seres humanos para embellecer, resaltar u ocultar distintos rasgos en el rostro del individuo mediante distintos productos especiales que lleva el nombre de cosméticos. Ya sea aplicado con los dedos o para un mejor acabado, con esponjas, pinceles o brochas. Con el objetivo de lucir de la mejor forma en momentos especiales como fiestas, reuniones o todos los días. Pérez (2018).

Utensilios aplicadores de maquillaje

El maquillaje ha ido evolucionando exponencialmente desde su creación en la antigüedad.

www.bdigital.ula.ve

Las personas que practican esta técnica anteriormente se aplicaban los distintos cosméticos muchas veces con las simples manos, pero, en la actualidad, existen utensilios especializados para todo tipo de producto que se va a aplicar en el rostro. Se clasifican de la siguiente manera:

- Esponjas: Las esponjas se han convertido es una gran herramienta a la hora de tener un acabado mejor y natural a la hora de difuminar la base de maquillaje, permite aplicar de manera precisa y sin la necesidad de usar las manos. Sin embargo, hay que lavarlas regularmente para evitar la contaminación por bacterias u hongos. Existen muchos tipos de esponjas hoy en día, pero la más famosa está elaborada con microfibra; tiene forma de un huevo y lleva el nombre de "BeautyBlender". Otros tipos de esponjas son:
  - *Esponja de silicona*: Como su nombre lo indica, está elaborada de solo silicona, con el fin de no desperdiciar producto a la hora de su aplicación. Fue creada en 2017.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- *Esponjas minis*: Es una versión más pequeña de la BeautyBlender y están diseñadas para difuminar y corregir en áreas más pequeñas del rostro.
- *Esponja ergonómica*: Su forma cuenta con una hendidura en el medio con la finalidad de colocar los dedos en esa parte, dando una más comodidad para el que la utilice. Trabaja para las zonas más amplias del rostro como lo son la frente y las mejillas.
- *Esponja clásica*: Comúnmente tienen forma triangular o son redondeadas y planas. Se caracterizan por ser las primeras esponjas en aparecer en el mercado. Sin embargo, con la creación de las anteriores mencionadas, esta no deja un cavado mejor en el rostro.

- Brochas: Esta categoría es la más variada. No obstante, hay que acotar que existen dos tipos de material con la que fabrican las brochas las cuales son: las de cerdas naturales, que están elaboradas a base de pelos de animales y las cerdas de fibra sintética, estas tienen la ventaja de ser antibacterianas por ser menos porosas que el pelo natural. De igual forma, es beneficiosa para las personas que sufren alergias al pelo animal. Faada (2016). También las brochas se clasifican por: el corte de pelo de la brocha, ya que cada una exige diferentes funciones, por la longitud del pelo, ya sea corto o denso para un difuminado específico en el rostro y finalmente por el tamaño de la brocha.

www.bdigital.ula.ve

Por el corte del pelo: Brochas de corte redondo, en punta, biselado y plano.

- Brochas de corte plano: se utilizan sobre todo para aplicar polvos y bases en todo el rostro, tanto fluidas como compactas. Permiten un acabado uniforme y natural porque atrapan mucha cantidad de producto y lo van soltando de manera equitativa, permitiéndonos incluso difuminar.
- Brochas de corte redondeado: permiten cierta precisión a la hora de aplicar el maquillaje y atrapan menor cantidad que las de corte plano. Sirven por ejemplo

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

para aplicar colorete en las manzanas de las mejillas, aunque también, para aplicar todo tipo de polvos sobre el rostro.

- Brochas en punta: permiten atrapar menos producto y aplicarlo de forma más precisa. Se utilizan por ejemplo a la hora de aplicar correctores y contornos o, si son pinceles de ojos, para aplicar tonos oscuros bajo la banana o definir la «V» externa.
- Brochas de corte biselado: el corte en diagonal se adapta a las formas peculiares de nuestro rostro. Se utiliza para cubrir zonas que nos son planas, como los pómulos o la parte de la banana del ojo, y aplicar el producto de un modo más difuminado.
- Además, encontrarás brochas singulares como la que tiene forma de abanico, pensada para aplicar ligeros toques de maquillaje polvo o polvos traslúcidos y para las máscaras de pestañas. Trueba (2019).

www.bdigital.ula.ve

Definición de términos

Microbiología

La microbiología es la ciencia encargada del estudio y análisis de los microorganismos, seres vivos diminutos no visibles al ojo humano, también conocidos como microbios. Se dedica a estudiar los organismos que son sólo visibles a través del microscopio: organismos procariotas y eucariotas simples. Murray (2014)

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Cosmetología

La cosmetología es el estudio y el arte sobre el uso de cosméticos o productos con el fin de embellecer la apariencia física. La cosmetología es la aplicación de productos para mejorar la estética facial y corporal usando terapias para la piel, el pelo y las uñas. Trueba (2017)

Estética

Se refiere a los centros de embellecimiento que incluyen servicios como depilación, cuidado de la piel, maquillajes, masajes reductores, tratamientos rejuvenecedores, etc. Trueba (2019)

Cultivo Primario

Es la inoculación primaria de la muestra en una superficie agarizada. También, se refiere a la siembra por estría del inoculó con asa de alambre en los cuatro cuadrantes de la placa. La finalidad de esta técnica es diluir suficiente el inóculo para que se puedan obtener las colonias de bacterias aisladas, denominadas unidades formadoras de colonias (UFC). Ibarguren (2019)

www.bdigital.ula.ve

Microorganismos Aerobios Mesófilos

Son microorganismos capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno libre, a la presión ordinaria y a una temperatura comprendida entre 15ºC y 45°C, siendo el rango de temperatura óptima de crecimiento de entre 30ºC y 40ºC.

Estos microorganismos reflejan la calidad sanitaria de los productos analizados, así como las condiciones higiénicas utilizadas durante el proceso de fabricación y almacenamiento. Es decir, el recuento de estos microorganismos se considera como un indicador del grado de contaminación y de la vida útil del producto. Cáceres (2018)

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Género Pseudomonas sp.

Es un bacilo Gram negativo móvil, que mide entre 0.6 - 2µm, se puede presentar en pares o cadenas cortas. Está ampliamente distribuido en la naturaleza, en suelos y agua; donde juega un papel importante en la descomposición de la materia orgánica. Poseen una cápsula constituida de polisacárido intracelular. Crecen en un rango de temperatura de 10-42ºC y producen pigmentos como verde, marrón, azul y rojo. Son oxidasa positiva, no fermenta los carbohidratos. Como determinantes de patogenicidad poseen mecanismos de adherencia por pili y cilios, evaden la fagocitosis por la presencia de una capa polisacárida extracelular, poseen enzimas como las lipasas, fosfolipasas y lecitinas que provocan daño tisular y poseen endotoxinas y exotoxinas. Murray (2014)

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Operacionalización de las variables

Para operacionalizar el sistema de variables o el evento de estudio con el respectivo criterio de análisis, es necesario la definición conceptual y la operacional de las mismas. Pérez (2009), Hurtado (2010). En tal sentido, las variables se operacionalizan con la finalidad de identificar los elementos y datos empíricos que expresan su presencia. En esta investigación se medirán las variables género *Staphylococcus*, de carácter dependiente y producción de biofilm en instrumentos aplicadores de maquillaje, de tipo independiente, con el fin de confirmar si existe correlación entre ambas variables, a través de la obtención de muestras de los instrumentos aplicadores de maquillaje, aislamiento del género *Staphylococcus*, investigación de la presencia de biofilm y correlación con las especies *S. aureus* y *Staphylococcus* sp. La parte experimental fue realizada en intervalo (de Abril a Junio de 2022), los indicadores derivarán de las bases teóricas. El proceso de la operacionalización de las variables garantiza el cumplimiento de los objetivos propuestos, de esta forma fueron alcanzados.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 1. Operacionalización de la variable dependiente Género *Staphylococcus* en instrumentos aplicadores de maquillaje

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Género *Staphylococcus*	Dependiente	El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 µm, agrupados como células únicas, en pares, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Son bacterias inmóviles, no esporuladas, no poseen cápsula, producen catalasa y son anaerobias facultativas.
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
Técnicas de diagnóstico microbiológico	• Examen directo. Tinción de Gram	Presencia de cocos Gram positivos dispuestos en racimos
	• Siembra en medio de cultivo Agar Manitol Salado	*S. aureus* pigmentación amarilla por la fermentación del manitol. Los *Staphylococcus* coagulasa negativos no fermentan el manitol y crecen en el medio formando colonias pequeñas de color que varía de blanco a rosado
	• Prueba clave Catalasa	Catalasa positiva
	• Prueba bioquímica Coagulasa	Positiva: *S. aureus* Negativa: *Staphylococcus* sp.

Fuente: González, Zambrano, y Alviarez, 2019

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente Producción de biofilm en instrumentos aplicadores de maquillaje

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Biofilm en instrumentos aplicadores de maquillaje	Independiente	Son comunidades microbianas complejas que contienen bacterias y hongos, su función es proteger a los microorganismos de las amenazas externas. Una biopelícula puede describirse como un conjunto de bacterias incrustadas en una barrera densa y viscosa de azúcares y proteínas.
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
Método de tubo: Descrito por Christensen et al.1982	Determinación cualitativa	La formación firme de un acumulo violeta alrededor de la superficie y en fondo de los tubos se considerará como una prueba positiva para la producción de biopelícula en cada cepa estudiada.

Fuente: González, Zambrano, y Alviarez, 2019.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Hipótesis

Hipótesis alternativa

Si existe relación entre el género *Staphylococcus* y la producción de biofilm en instrumentos aplicadores de maquillaje en las principales estéticas de la ciudad de Mérida de Abril a Junio de 2022.

Hipótesis nula

No existe relación entre el género *Staphylococcus* y la producción de biofilm en instrumentos aplicadores de maquillaje en las principales estéticas de la ciudad de Mérida de Abril a Junio de 2022.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Hurtado (2010) refirió que el tipo de investigación tiene relación con la interrogante de estudio en la cual se resalta lo que se quiere saber. Pues esto marca el logro general que se desea conseguir durante el proceso de la investigación. En consecuencia, el verbo a utilizar en el objetivo tiene que implicar un logro. Específicamente, durante esta investigación se quiere confirmar la relación entre los elementos del evento de estudio. Es decir, se buscará confirmar la relación entre el género *Staphylococcus* y la producción de Biofilm en una unidad de estudio y un contexto determinado. Por lo tanto, este trabajo corresponde a una investigación confirmatoria.

www.bdigital.ula.ve

Diseño de Investigación

Hurtado (2010), describió que el diseño de investigación se debe determinar a través de las estrategias que se implementan para recolectar la información en una fuente determinada, en un tiempo específico, y en una cantidad o amplitud asociada a lo que se quiere saber. En tal sentido, esta investigación tendrá un diseño de campo porque los datos serán recolectados en un ambiente natural como lo son las principales estéticas de la ciudad de Mérida. Entre otras estrategias, se considerará la recolección muestras en un momento determinado y contemporáneo, por lo que tiene un diseño transeccional; así como, la característica multivariable de la amplitud de la información que será recolectada.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Población y Muestra

Unidad de investigación

El grupo de estudio está representado por los instrumentos aplicadores de maquillaje de las principales estéticas de la ciudad de Mérida, desde Abril a Junio de 2022. Teniendo un criterio de inclusión los que pertenece a la clasificación de brochas, pinceles y esponjas.

Selección del tamaño muestral

www.bdigital.ula.ve

La "n" muestral está representada por 25 muestras recolectadas por medio de hisopados a los instrumentos aplicadores de maquillaje (esponjas, borlas, brochas y pinceles) usados en las principales estéticas de ciudad de Mérida.

Sistema de Variables

Las variables que guardan relación con el propósito de esta investigación son las siguientes: variable dependiente (VD): género *Staphylococcus*, variable independiente (VI): producción de biofilm. Estas variables corresponden a los núcleos semánticos del problema de investigación y a la vez, permiten la verificación del fenómeno de estudio en la unidad de investigación.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Instrumento de recolección de datos

Según Palella y Martins (2006) y Pérez (2009), un instrumento permite recolectar los datos para medirlos, posteriormente, a través de modelos matemáticos.

Se elaboró un instrumento de recolección de datos, que fue llevado a juicio de expertos, quienes evaluaron cada ítem. Para medir el coeficiente de validez de contenido (CVC), que propusieron Alviarez, González y Zambrano (2022), y así verificaron su concordancia y validez. (Anexo 1)

Procedimiento de la Investigación

Recolección y transporte de las muestras

www.bdigital.ula.ve

En 5 de las principales estéticas de la ciudad de Mérida fueron recolectadas las muestras con la técnica de hisopado a partir de los instrumentos aplicadores de maquillaje (esponjas, borlas, brochas, pinceles) estos se colocaron en el medio Stuart (medio de transporte) y un caldo enriquecido Letheen; para así ser llevadas hasta el laboratorio de Bacteriología Clínica Roberto Gabaldón en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes en donde se inició el Procesamiento.

Detección de Microorganismos Aerobios Mesófilos

A partir del Caldo Letheen o Solución Madre en donde fue sembrada cada muestra; se realizaron diluciones seriadas 10:6, 10:4 y 10:2 y Posteriormente fueron Sembradas en Agar Letheen para realizar el recuento de Aerobios Mesófilos y establecer una clara comparación de acuerdo a los límites de aceptabilidad dictados por la Norma COVENIN 1104:1996

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Cultivos primarios

En el laboratorio las muestras fueron sembradas en los medios de cultivo Agar BHI y Agar Manitol Salado de la casa comercial BBL para el aislamiento específico de los cocos Gram positivos pertenecientes al género *Staphylococcus*, incubado de 18 a 24 horas (Manitol Salado) y de 24 a 48 horas (BHI) en aerobiosis. Cumpliendo con lo establecido en cosméticos según la norma ISO 22718:2006.

Identificación de Pseudomonas sp.

Esta identificación se llevó a cabo para cumplir con las indicaciones de la norma Covenin 1104:1996 por medio de las técnicas descritas en las normas ISO 22717, siendo parte importante del proceso conocer si existe la presencia de este microorganismo que represente un determinante de la calidad microbiológica en el área de cosmética de gran importancia.

www.bdigital.ula.ve

Examen directo. Tinción de Gram

Para corroborar la presencia del género bacteriano *Staphylococcus* se llevó a cabo la tinción de Gram confirmando la morfología bacteriana que corresponde a los mismos como lo son los cocos Gram positivos dispuestos en racimos.

Realización de prueba clave: catalasa

El género *Staphylococcus* tiene la particularidad de ser catalasa positiva ya que posee esta enzima, capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre. De igual forma, esta prueba tuvo la utilidad de diferenciarlo de otros géneros como *Streptococcus* y *Enterococcus* no productores de catalasa.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Identificación por la prueba bioquímica: coagulasa

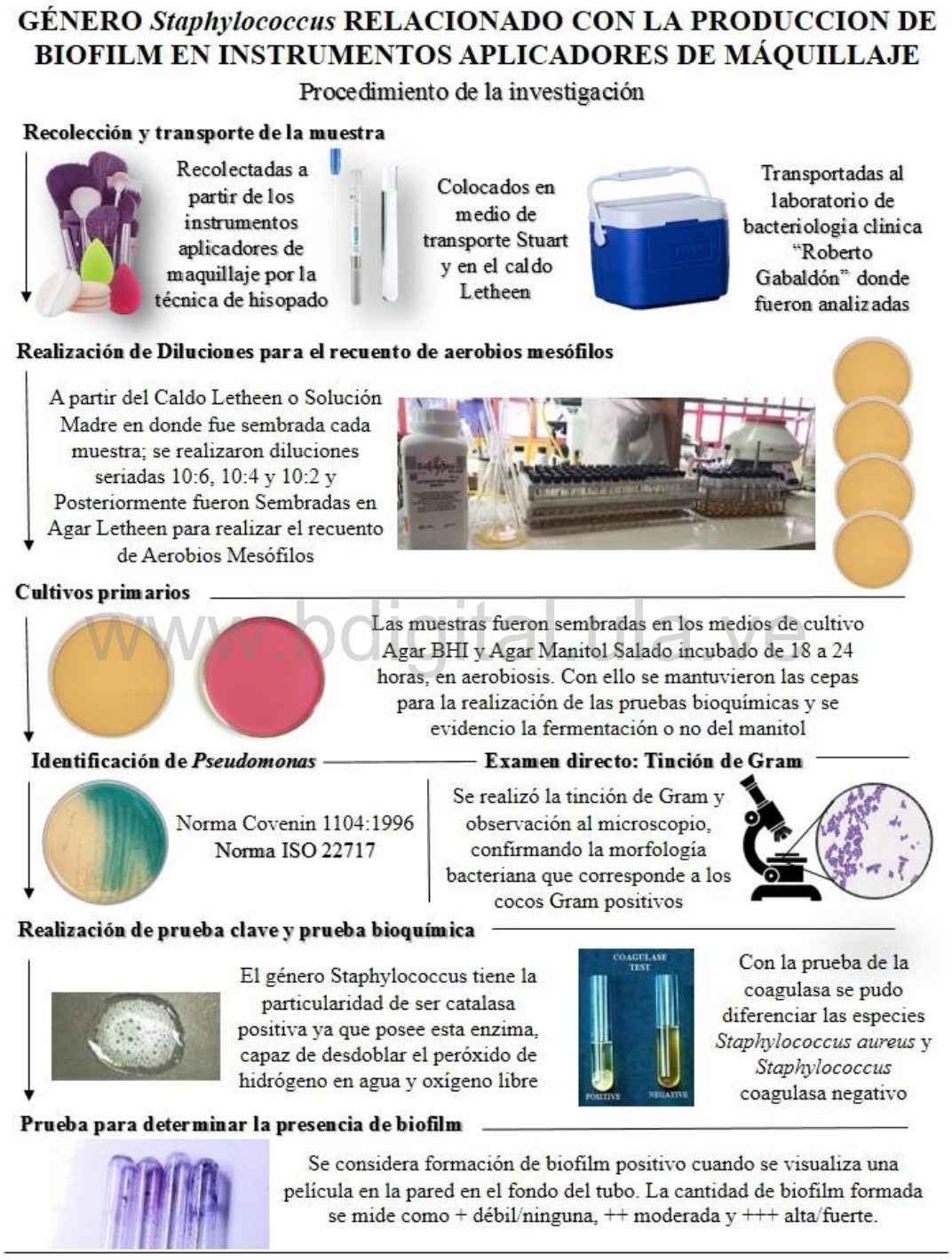
Con la prueba de la coagulasa se diferenciaron las especies *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus* sp. Lo que posteriormente será necesario para demostrar si la presencia del biofilm predomina en una especie o en la otra.

Prueba para determinar la presencia del biofilm

38Se determinó la producción de Biofilm utilizando el Método de tubo: Descrito por Christensen et al.1982, en el cual se incuba el microorganismo estudiado en 10 mL de medio de caldo de soya tripticasa con 1% de glucosa en tubos. Se incuba a 37ºC por 24 hrs. Posterior a incubación, los tubos se decantan y lavan con solución salina buffer fosfato (pH7.3) y se seca. Se tiñen los tubos con cristal violeta (0.1%) El exceso de tinción se lava con agua desionizada, Se secan los tubos y se invierte su posición. Se considera formación de biofilm positivo cuando se visualiza una película en la pared en el fondo del tubo. La cantidad de biofilm formada se mide como + débil/ninguna, ++ moderada y +++ alta/fuerte.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



Esquema 1. Esquematización del procedimiento de la investigación. González, Zambrano y Alviarez 2022

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Diseño de análisis

Los resultados de esta investigación fueron analizados a través del enfoque cualitativo. Se tomaron los datos relacionados con el problema de investigación: relación entre el género *Staphylococcus* asociado a la producción de biofilm. Por tanto, los datos fueron interpretados mediante técnicas estadísticas descriptivas, con el fin de buscar confirmar las relaciones del problema planteado.

Los datos cualitativos se presentaron con frecuencias absolutas y relativas (en porcentajes). La asociación estadística de datos cualitativos (análisis bivariados) se evaluó aplicando la prueba chi cuadrado. La significancia estadística se consideró para valores de $p < 0,05$. Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron con los programas SPSS versión 21 (IBM Corporation, New York, US), Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, US) y GraphPad Prism versión 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, USA).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

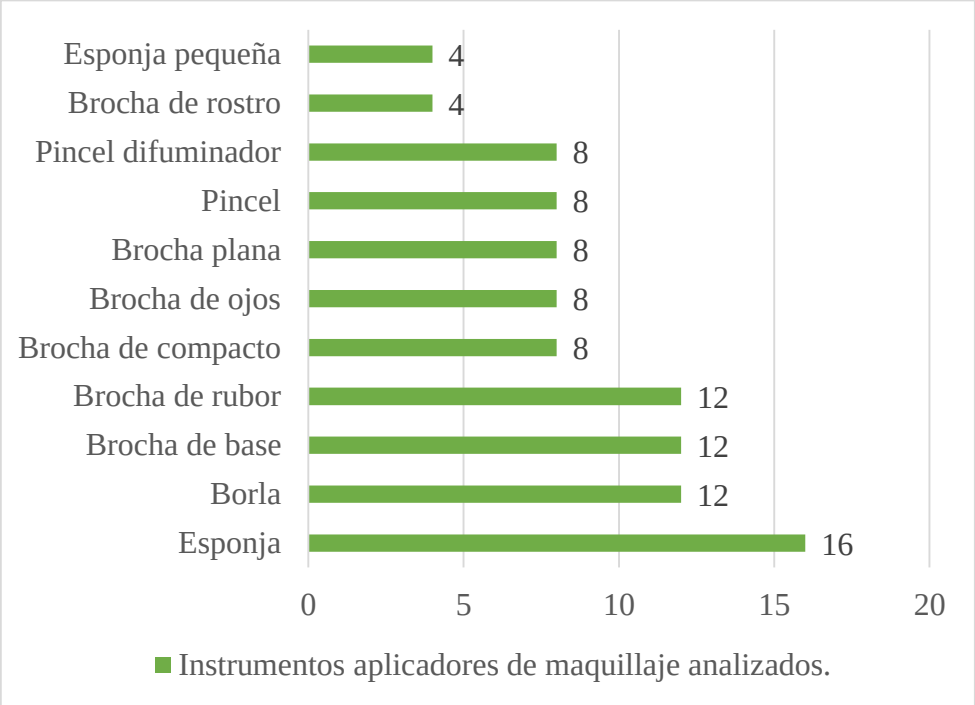
En la búsqueda de confirmar la relación entre el género *Staphylococcus* y la producción de biofilm; fueron analizadas en el Laboratorio de Microbiología Roberto Gabaldón; las muestras provenientes instrumentos aplicadores de maquillaje (brochas, pinceles, esponjas y borlas) de 5 diferentes estéticas, la totalidad de los instrumentos fue la siguiente: 4 esponjas (16%), 3 Borlas (12%), 3 Brochas de base (12%), 3 Brochas de rubor (12%), 2 Brochas de compacto (8%), 2 Brochas de ojos (8%), 2 Brochas planas (8%), 2 pinceles (8%), 2 pinceles difuminadores (8%), 1 Brocha de rostro (4%) y 1 esponja pequeña (4%); para un total de 25 muestras (100%) **(Tabla 3)**

www.bdigital.ula.ve

Tabla 3. Instrumentos aplicadores de maquillaje analizados.

	Frecuencia	**Porcentaje**
Objeto		
Esponja	4	16
Borla	3	12
Brocha de base	3	12
Brocha de rubor	3	12
Brocha de compacto	2	8
Brocha de ojos	2	8
Brocha plana	2	8
Pincel	2	8
Pincel difuminador	2	8
Brocha de rostro	1	4
Esponja pequeña	1	4
Total	25	100

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



www.bdigital.ula.ve

Figura 1. Instrumentos aplicadores de maquillaje analizados, que corresponde a la Tabla 3

Seguidamente y en cumplimiento de la norma COVENIN 1104:1996, para procedimientos de microbiología en cosmética, se realizó la detección de Microorganismos aerobios mesófilos; así bien, a partir de cada muestra madre se realizaron diluciones 10:6, 10:4 y 10:2. De esta forma el 73% tuvo un crecimiento de $10x10^4$ UFC/mL o >1.600NMP; el 6% tuvo un crecimiento de $7.5x10^4$ UFC/mL o 1.600NMP; el 7% tuvo un crecimiento de $5x10^4$ UFC/mL o 44NMP; un 2% tuvo un crecimiento de $2.5x10^4$ UFC/mL o 26NMP; un 4% un crecimiento $<2.5x10^4$ UFC/mL o 0NMP y un 8% no tuvo crecimiento; esto para un total del 100% (100 muestras); resultados que fueron tomados en cuenta para la comparación de acuerdo a los límites de aceptabilidad reflejados en la **Tabla 4**.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 4. Límites de microorganismos aerobios mesófilos

Muestras %	UFC/mL	NMP	Límites	
			Inferior	**Superior**
73	$10x10^4$	>1.600	600	5.300
6	$7.5x10^4$	1.600	600	5.300
7	$5x10^4$	44	12	65
2	$2.5x10^4$	26	11	15
4	$<2.5x10^4$	0	-	15
8	No hubo crecimiento	-	-	-

De igual forma como parte del procedimiento indicado en la Norma Covenin 1104:1996, fue necesario realizar la detección del género *Pseudomonas*, ya que este se conoce como un patógeno importante en la industria cosmética. De las 25 muestras estudiadas, fue hallado este microorganismo en 3 muestras analizadas, representando un 12% de la totalidad

www.bdigital.ula.ve

Tabla 5. Identificación de *Pseudomonas* sp.

	Frecuencia	**Porcentaje %**
Bacteria		
Pseudomonas sp.	3	12
Total	25	100

Dando continuidad al proceso fue realizada la tinción de Gram; en donde en el 100% representado ahora por 23 muestras en las cuales si hubo crecimiento; se observaron Cocos Gram positivos. **(Tabla 6)**

Tabla 6. Resultados de la tinción de Gram.

	Frecuencia	**Porcentaje %**
Tinción de Gram		
Cocos Gram positivos	23	100

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Así bien se procedió a la realización de los cultivos primarios, en agar BHI y agar Manitol Salado. Inicialmente fue evaluada la fermentación del Manitol; de la cual cabe destacar que fue posible encontrar dos diferentes cepas en una misma muestra, una que era capaz de fermentar el manitol y otra que no; esto ocurrió en dos de las muestras analizadas. Así bien, 17 cepas aisladas (68%) fueron fermentadoras del manitol, mientras que las otras 8 cepas no eran capaces de fermentar el manitol; esto para un total de 25 cepas aisladas a partir de las muestras sembradas en los medios. **(Tabla 7)**

Tabla 7. Resultados de la fermentación en manitol.

	Frecuencia	**Porcentaje %**
Fermentación del manitol		
Positiva	17	68
Negativa	8	32
Total	25	100

www.bdigital.ula.ve

De igual forma, se evaluó el crecimiento de en el medio Manitol Salado Obteniendo los siguientes resultados: 24 cepas (96%) crecieron de manera abundante mientras que 1 cepa (4%) creció de forma escasa. **(Tabla 8)**

Tabla 8. Resultados del crecimiento en manitol.

	Frecuencia	**Porcentaje %**
Crecimiento en manitol		
Abundante	24	96
Escaso	1	4
Total	25	100

Posteriormente fueron realizadas las pruebas clave: Catalasa y Coagulasa para identificar a los microorganismos aislados. En cuanto a la prueba de la Catalasa: 24 cepas (96%) dieron un resultado positivo, mientras que 1 cepa (4%) dio un resultado negativo. Por su parte en la prueba de la Coagulasa 17 cepas (68%) fueron positivas, mientras que 8 cepas (32%) fueron negativas. **(Tablas 9 y 10)**

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 9. Resultados de la catalasa.

	Frecuencia	Porcentaje
Catalasa		
Positiva	24	96
Negativa	1	4
Total	25	100

Tabla 10. Resultados de la coagulasa.

	Frecuencia	Porcentaje
Coagulasa		
Positiva	17	68
Negativo	8	32
Total	25	100

Es de esta forma como se logró realizar el aislamiento e identificación de las cepas de importancia para la investigación. Y así bien los resultados fueron: 16 cepas (64%) se identificaron como *Staphylococcus aureus*; 8 cepas (32%) se identificaron como *Staphylococcus* sp. y 1 cepa (4%) representaba un Coco Gram Positivo por identificar **(Tabla 11)**

www.bdigital.ula.ve

Tabla 11. Cocos Gram Positivos identificados.

	Frecuencia	Porcentaje
Bacteria		
Staphylococcus aureus	16	64
Staphylococcus sp.	8	32
Coco Gram positivo por identificar	1	4
Total	25	100

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

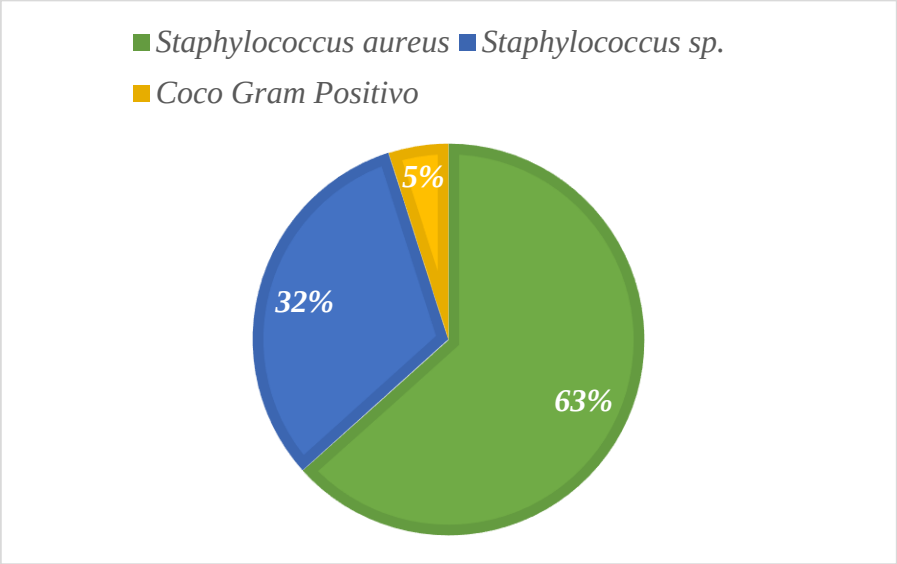


Figura 2. Cocos Gram positivos identificados, que corresponde a la Tabla 11

Por consiguiente, se realizó la evaluación de la variable independiente; procediendo con la prueba del biofilm; la cual tuvo como resultado: 8 microorganismos (32%) producían biofilm de manera abundante, 9 Microorganismos (36%) moderada; 2 microorganismos (8%) escaso y 6 microorganismos (24%) no produjeron biofilm. **(Tabla 12)**

www.bdigital.ula.ve

Tabla 12. Producción de biofilm

	Frecuencia	**Porcentaje**
Producción de biofilm		
Abundante (+++)	8	32
Moderada (++)	9	36
Escasa (+)	2	8
Negativo (-)	6	24
Total	25	100

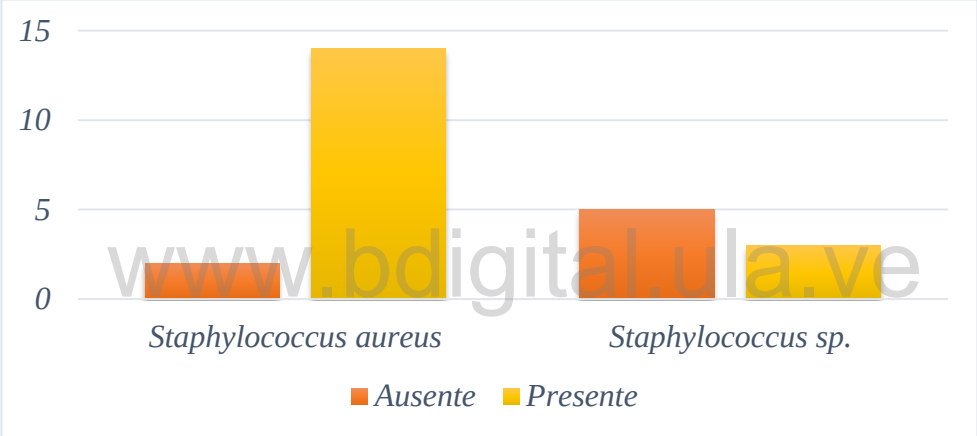
Finalmente, se llevó a cabo la comparación de las especies de interés aisladas con la producción de biofilm para poder alcanzar el objetivo planteado. De esta forma, de 16 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas (66.7%), 2 (28.6%) no producían biofilm y 14 (82.4%) si producían biofilm. Por su parte, de 8 cepas de *Staphylococcus*

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

sp. Aisladas (33.3%), 5 (71.4%) no producían biofilm y 3 (17.6%) si producían biofilm. Lo cual refiere un "valor de p" de 0.011 **(Tabla 13)**

Tabla 13. Relación de Bacterias identificadas con la producción de biofilm.

	Producción de biofilm			
	Ausente	**Presente**	**Total**	**Valor de p**
Bacteria				0,011
Staphylococcus aureus	2 (28,6)	14 (82,4)	16 (66,7)	
Staphylococcus sp.	5 (71,4)	3 (17,6)	8 (33,3)	
Total	7 (100)	17 (100)	24 (100)	



www.bdigital.ula.ve

Figura 3. Relación de Bacterias identificadas con la producción de biofilm, que corresponde a la Tabla 13

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Discusión

A través del tiempo el género *Staphylococcus* ha sido de gran relevancia por su capacidad para causar diversidad de enfermedades, colonizar en organismos vivos e inertes y buscar los medios para lograr sobrevivir a resistir ante cualquier técnica por la que se desee eliminar. Esto refiere la importancia del objetivo presentado en esta investigación. El área de la cosmética, involucra una gran variedad de personajes que por su función puedes representar un medio de contaminación; dentro de estos se encuentran los instrumentos aplicadores de maquillaje, que de acuerdo a su uso pueden constituir un medio de albergue y crecimiento de bacterias; en este caso las de interés estarán formadas por el género *Staphylococcus*, las cuales para lograr subsistir y mantenerse buscaran mecanismos tales como la producción del biofilm, creando así un escudo que para romper y eliminar requerirá de la adecuada desinfección o en ciertos casos su reemplazo.

www.bdigital.ula.ve

Para dar cumplimiento al objetivo planteado, fueron analizados 5 diferentes instrumentos en cada una de las 5 estéticas, la totalidad de los instrumentos fue la siguiente: 4 esponjas, 3 Borlas, 3 Brochas de base, 3 Brochas de rubor, 2 Brochas de compacto, 2 Brochas de ojos, 2 Brochas planas, 2 pinceles, 2 pinceles difuminadores, 1 Brocha de rostro y 1 esponja pequeña; para un total de 25 muestras. Cierta similitud en cuanto a una investigación en cosmética y maquillaje específicamente, se manifiesta al ser comparado con el estudio de Carmona (2022), en donde seleccionaron tres tipos de productos de maquillaje con variación de marcas y fueron muestreados a tres individuos diferentes de la ciudad de Bogotá D.C. Las formas farmacéuticas a muestrear fueron líquidas (pestañina), sólidas (polvos o sombras) y semisólidas (labiales).

Cáceres en el 2018, en su investigación sobre la calidad microbiológica de cosméticos capilares elaborados a base de compuestos naturales comercializados en Lima Metropolitana encontró que en la mayoría de las muestras analizadas el valor de

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

aerobios mesófilos fue superior a 29x104UFC/mL, que indica un valor elevado si se compara con las normas ISO suyo límite superior fue de 5x103UFC/mL. En nuestra investigación el 73% de las muestras de instrumentos aplicadores de maquillaje, presentaron un valor superior a 10x104UFC/mL o >1.600NMP; al igual que el autor anterior, el contaje de aerobios mesófilos, fue elevado.

Carmona en el 2022 en su trabajo a cerca de la 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. ensayó 9 muestras para conocer la presencia del género S*taphylococcus* como marcador de calidad microbiológica de los productos de maquillaje (labiales y pestañinas), determinando que el mismo se encontraba en los mencionados productos en un 22.22% del total de las muestras analizadas. En el presente estudio hubo presencia de cepas pertenecientes al género *Staphylococcus* en un 96% del total de muestras, indicando un hallazgo superior en comparación al estudio confrontado.

www.bdigital.ula.ve

Andrade y Valdiviezo en el 2012, realizaron una investigación titulada Control microbiológico de cosméticos elaborados artesanalmente en base de productos naturales en la Ciudad de Quito, en la cual llegaron a analizar un total de 10 muestras de cosméticos provenientes de 2 diferentes fabricantes y obteniendo resultados negativos en el total de muestras para el aislamiento de *Pseudomonas*; mientras que, resultante de esta investigación, donde fueron analizadas 25 muestras, se obtuvo 3 muestras, equivalente a un 12% con resultado positivo para la presencia de *Pseudomonas* como marcador de calidad microbiológica.

Finalmente, al establecer una relación entre el género *Staphylococcus* con la producción del biofilm es importante tomar en cuenta que estudios realizados previamente han logrado una meta similar a esta aunque proveniente de diferentes muestras. En esta investigación, a partir de muestras de instrumentos aplicadores de maquillaje; de 16 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas 2 no producían biofilm y

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

14 si producían biofilm. Por su parte, de 8 cepas de *Staphylococcus* sp. Aisladas, 5 no producían biofilm y 3 si producían biofilm. Equivalente a esto fue la investigación de Ibarguren (2019) quien para buscar esta relación, determinó la presencia de los genes que favorecen la producción de biofilm (icA y bap) en cepas de *Staphylococcus* sp. De las 16 cepas de *Staphylococcus* aisladas detectaron la presencia de los genes icaA e icaD simultáneamente en 3 cepas: *S. aureus* (2/7) y en una de las dos cepas de *S. pseudointermedius*. Por otro lado detectamos sólo la presencia del gen icaD en 3 cepas: *S. pseudointermedius* y en las dos cepas de *S. haemolyticus* aisladas. En ninguna de las cepas aisladas detectamos el gen bap.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Dando cumplimiento a la norma Covenin 1104:1996, se evaluó la calidad microbiológica de los instrumentos aplicadores de maquillaje con respecto a la detección de microorganismos aerobios mesófilos, tomando en cuenta que el mayor porcentaje de ellos, pese a estar dentro de los límites de NMP, presenta un recuento elevado, mostrando una señal alarmante que indica altos niveles de contaminación en los instrumentos.

Se comprobó la presencia del género *Staphylococcus* en los instrumentos aplicadores de maquillaje, con un 64% (16 cepas) como *Staphylococcus aureus*, un 32% (8 cepas) *Staphylococcus* sp. Y por último un 4 % (1cepa) como coco Gram positivo por identificar; realizando este análisis mediante técnicas microbiológicas y normas que están sujetas a estos tipos de trabajo de investigación, obteniendo resultados satisfactorios.

www.bdigital.ula.ve

Se evidenció la presencia del género *Pseudomonas*, para también cumplir con las directrices de la norma Covenin 1104:1996, y con el procedimiento indicado en las normas ISO 22717. Encontrando este microorganismo en 3 de las 25 muestras analizadas

Se demostró que la producción de biofilm en las cepas aisladas pertenecientes al género *Staphylococcus* producía biofilm de manera abundante (32%), moderada (36%), escaso (8%) y que no produjeron biofilm se pudo encontrar un 24%.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Se verificó las especies aisladas del género, dentro de las cuales se identificaron: *Staphylococcus* sp. y *Staphylococcus aureus*, en los instrumentos aplicadores para maquillaje, alcanzando los objetivos planteados de esta investigación.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Recomendaciones

- Una vez realizada esta investigación es relevante notar la importancia que representa una nueva línea de investigación. Es por ello, que se recomienda darle continuidad para contar con las bases necesarias que hagan un verdadero cambio en el ámbito de la cosmética
- Ya que esta investigación estuvo delimitada al plano bacteriológico, específicamente al género *Staphylococcus*; se sugiere, se hagan investigación para detección de otros géneros e incluso de microorganismos en el plano micológico
- De igual forma, sería importante conocer qué tantos otros mecanismos de supervivencia puedan estar implementando las bacterias dentro de las superficies evitando su eliminación.
- Si este tipo de bacterias son productoras de diversas patologías también es importante conocer qué tan multiresistentes son; por ello se exhorta a la investigación de antibiogramas de las cepas estudiadas.
- Una vez fueron obtenidos los resultados y se conoce de esta contaminación, surge la duda de si proviene específicamente del ambiente llegado al instrumento o si esto es originado por el producto de maquillaje como tal, por lo que para una futura investigación se sugiere el análisis de los productos cosméticos usados
- A las estéticas se recomienda realizar la limpieza y desinfección adecuada de todos sus instrumentos, utilizando las técnicas que permitan la remoción de contaminantes en forma de biofilm y de ser posible, la esterilización y almacenamiento en condiciones de esterilidad. El uso personalizado y asimismo tomar en cuenta el reemplazo cada cierto tiempo de los instrumentos.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

BIBLIOHEMEROGRAFÍAS

Andrade, A. Valdiviezo, A. (2012). *Control microbiológico de cosméticos elaborados artesanalmente en base de productos naturales en la Ciudad de Quito.* Ecuador.

Becker, K, et al. (2014). *Coagulase-negative Staphylococci*. Clinical Microbiology Reviews.

Becker et al. (2019). Implications of identifying recently defined members of the *Staphylococcus aureus* complex *S. argenteus* and *S. schweitzeri*: a position paper of members of the ESCMID Study Group for Staphylococci and Staphylococcal Diaeases (ESGS). *Revista Clinical Microbiology and Infection,* 25 (2019) 1064-1070.

Cáceres, M. (2018). *Determinación de la calidad microbiológica de cosméticos Capilares elaborados a base de compuestos naturales comercializados en Lima Metropolitana.* Lima, Perú.

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.

Chans, G. (2002). *ESTAFILOCOCOS.*

Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL. y Beachey EH. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immunol.* 1982; 37:318-26.

Cervantes, E. García, R. Salazar, P. (2014). *Características generales del Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio. México

Comisión Venezolana de Normas Industriales COVENIN 1104:1996

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Constanza, L. Pinilla, G. Navarrete, J. (2017). *Biopelícula en Staphylococcus spp.* Enfermedades infecciosas y Microbiología. Vol 37. Colombia.

Creench, C. Talbot, T. Schaffner W. (2006). *Community associated methicillin resistant Staphylococcus aureus the way to wound is through the nose*. J Infect Dis.

Cruz, M. García, C. (2017). *Calidad de rubores cosméticos comercializados en emporio Albarracín*. Trujillo. Perú.

Faada. (2016). *¿Sabes de qué están hechas tus brochas de maquillaje?* Extraído de: http://faada.org/actualidad-580-sabes-de-que-estan-hechas-tus-brochas-de-maquillaje

Gil, Microbitos. (2011). *Staphylococcus aureus, S. epidermidis*, y *S. saprophyticus.* Recuperado de http://microbitosblog.com/2011/08/03/staphylococcus-aureus-epidermidis-saprophyticus/. El 06- 06-2019.

www.bdigital.ula.ve

Hernández R., Fernández, C, Baptista, P. (2010**).** Definición del alcance de la investigación a realizar: exploratoria, descriptiva, correlacional o explicativa. En Metodología de la investigación, Chile: Mc Graw Hill. (Pp. 76).

Hurtado J. (2010). El proyecto de investigación, comprensión holística de la metodología y la investigación. Bogotá-Caracas: Ediciones Quirón. (Pp. 147-151).

Ibarguren, S. (2019) *Identificación de Staphylococcus spp. Y evaluación de la producción de biofilm.* UNCPBA. Argentina.

Kloss, W. Schleir, K. Goirtz, F. (1992). *The genus Staphylococcus*. eds. The Prokaryotes, 2nd Ed. New York.

Koneman (2008). *Diagnóstico microbiológico.* Madrid, España. Editorial médica Panamericana.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Kuroda, M. Ohta, T. Uchiyama, I. Baba, T. (2001). *Whole genome sequencing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Lancet.

Lasa, I. Del Pozo, J. Penades, J. Leiva, J. (2005). *Biofilms bacterianos e infección.*

Murray, P. Rosenthal, K. Pfaller, M. (2014). *Microbiología Médica.* Barcelona, España. Elsevier España, S.L.

Nazar, J. (2007). *Biofilms Bacterianos*. Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello.

OPS/OMS: *Educación en inocuidad de alimentos: Glosario de términos*. Extraído de: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10433:educacion-inocuidad-alimentos-glosario-terminos-inocuidad-de-alimentos&Itemid=41278&lang=es El 06-06-2019.

Ortega, S. Franco, R. (2014). *Importancia medica del biofilm de Staphylococcus epidermis en las infecciones de prótesis articular*. Revista de Investigación en Discapacidad vol.3. México.

www.bdigital.ula.ve

O´Toole G, et al. (2000). *Biofilm Formation as Microbial development*. Annu.Rev. Microbiol.

Pérez J. (2018). *Definición del Maquillaje.* Extraído de: https://definicion.de/maquillaje/. https://www.significados.com/cosmetologia/

Phillips, P et al. (2010). *Biofilms*. Made Easy. Wounds international. 1(1), edición 3. Disponible en www.woundsinternational.com.

Trueba D. (2017). *Tipos de Brochas y Pinceles de Maquillaje. Cómo Elaborar tu Kit Básico.* Extraído de: https://sevilla.abc.es/estilo/bulevarsur/noticias/belleza/tipos-de-brochas-y-pinceles-de-maquillaje-como-elaborar-tu-kit-basico/ El 10- 06-2019.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Trueba D. (2019). *Esponjas de maquillaje: Para qué sirve cada tipo.* Extraído de: https://sevilla.abc.es/estilo/bulevarsur/noticias/belleza/tipos-de-brochas-y-pinceles-de-maquillaje-como-elaborar-tu-kit-basico/. El 10- 06- 2019.

Trujillo, M. (2017). *Microbial Biofilms*. Universidad de la Laguna, España.

Von Eiff. E, Becker, K. Machka, K. Stammer, H. (2001). *Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia.* N Engl J Med.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Anexos

Anexo 1. Instrumento de recolección de datos

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DTO. DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN BACTERIOLOGÍA "DR. ROBERTO GABALDÓN"

GÉNERO *Staphylococcus* RELACIONADO CON LA PRODUCCION DE BIOFILM EN INSTRUMENTOS APLICADORES DE MÁQUILLAJE

Fecha: _____

N° de muestra: _____
Recolectada de: _____ Lugar: _____

www.bdigital.ula.ve

1. **Diluciones para detección de microorganismos aerobios mesófilos**
   10:10_____ 10:4_____
   10:6_____ 10:2_____

2. **Examen Directo**

Coloración de Gram:
_____

3. **Cultivo**

Agar Manitol Salado
Fermentación: _____ Crecimiento: _____

4. **Prueba Clave: Catalasa: _____**

5. **Prueba Bioquímica: Coagulasa: _____**

6. **Prueba del Biofilm: _____**

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Anexo 2. Instrumentos de la Primera Estética

www.bdigital.ula.ve

Anexo 3. Instrumentos de la Segunda Estética

Anexo 4. Instrumentos de la Tercera Estética

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

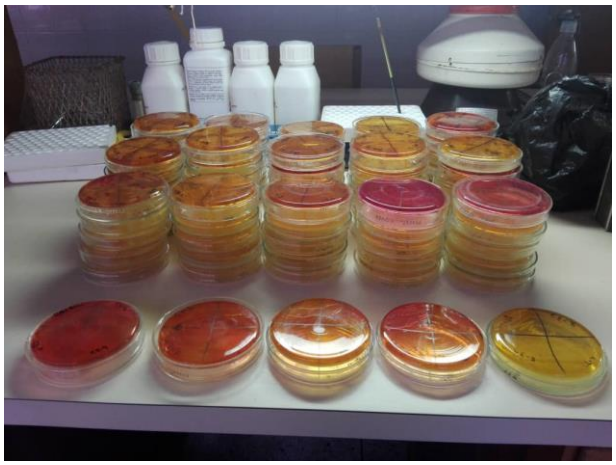
Anexo 5. Instrumentos de la Cuarta Estética

www.bdigital.ula.ve

Anexo 6. Instrumentos de la Quinta Estética

Anexo 7. Preparación de Caldo Letheen para diluciones de aerobios mesófilos

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



Anexo 8. Placas de Agar Letheen, BHI y Manitol Salado

www.bibital.ula.ve

Anexo 9. Realización de Prueba clave

Anexo 10. Prueba de Biofilm

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)