

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN-León

Área de conocimientos de Ciencias Químicas

Carrera de Farmacia



Trabajo Monográfico para optar al título de Químico Farmacéutico

Tema:

Verificación de la calidad microbiológica de fitofármacos comercializados en farmacias naturistas del municipio de león según RTCA 11.03.56.09.

Autor:

Br. Jessica María Argeñal Gonzales

Br. José David Coca Garcia

Br. Darwinn José Laínez Ocón

Tutor: Lic. Kelvin Núñez

León, julio 2024



Índice

1	Resumen	4
2	Introducción	5
3	Hipótesis	6
4	Objetivos.....	7
4.1	Objetivo general	7
4.2	Objetivos específicos	7
5	Marco teórico	8
5.1	Productos naturales de origen vegetal.	8
5.2	La calidad de un extracto vegetal.....	9
5.3	Los controles de calidad.....	9
5.4	Calidad microbiológica	10
5.5	Microorganismos mesófilos aerobios.	13
5.6	Microorganismos patógenos.	13
5.7	Las especies de bacterias patógenas de importancia son:	14
5.7.1	Escherichia coli:.....	14
5.7.2	Staphylococcus aureus.....	15
5.7.3	Pseudomonas aeruginosa:	17
5.7.4	Salmonella sp:	18
5.8	Hongos y levaduras:.....	19
5.9	Jarabes:	20
5.10	Control Microbiológico.....	21
5.11	Importancia del control microbiológico.	21
6	Diseño metodológico	24
6.1	Tipo de estudio:.....	24
6.2	Área de estudio:	24
6.3	Universo de estudio	24
6.4	Criterios de exclusión	24
6.5	Criterios de inclusión	24
	Unidad de análisis.....	25
6.7	Variables de estudio	25



6.8 Interacciones más frecuentes de variables	26
7 Procedimiento.....	27
7.1 Parte experimental.	27
7.1.1 Desarrollo de la investigación.....	27
7.1.2 procedimiento para la adquisición de la muestra	27
Procedimiento..... para Determinación de Microorganismos Recomendaciones Generales	27
7.1.3 Esterilización.....	28
7.1.4 Preparación de la cristalería	29
7.1.5 Esterilización de la ropa.....	30
7.1.6 Esterilizar ambiente	31
Desinfección y Sanitización del Área de Microbiología.....	32
7.2 Preparación de medios de cultivos.....	32
7.3 Recuento De Organismos Mesófilos Aerobios	33
Método En Placa	33
7.4 Recuento De Hongos Filamentosos Y Levaduras	35
7.5 Determinación De Microorganismos Patógenos	35
7.5.1 Salmonella	35
7.5.2 staphylococcus aureus	36
7.5.3 Echerichia coli.....	36
7.5.4 pseudomonas aeruginosa.....	36
7.6 Flujograma de proceso.....	38
8 Resultados y Análisis de los resultados	39
8.1	39
9 Conclusión:	42
10 Recomendaciones:.....	43
11 Bibliografía.....	44
12 Anexo	47



1 Resumen

La utilización de límite Microbiano como método de análisis para productos terminados con fines terapéuticos es importante, no solo porque a través de este se determina la presencia y cantidad de microorganismos en estos; sino porque también se puede garantizar la calidad de los mismos por medio de la aceptación o rechazo que se le debe dar a cada producto.

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de microbiología en el área de conocimientos de ciencias químicas UNAN-León. Con la finalidad de verificar si estos productos (fitofármacos) cumplen con los estándares de calidad descritos en el RTCA11.03.56:09 se realizó una evaluación de la calidad microbiológica de estos productos, utilizando los métodos de límites microbianos y números más probable. El procedimiento comprende la dilución de una alícuota de la muestra para ser incubada en un agar de enriquecimiento en el que la bacteria se nutre y fortalece, sin embargo, se nutren no solo el grupo bacteriano en cuestión sino todos los que estén presentes.

El cual se evaluaron 7 muestras de jarabes de distinto contenido de extracto vegetal medicinal. El resultado encontrado fue que 6 de las muestras analizadas resultaron con concentraciones superiores al límite permisible declarándose no apto para el consumo humano, mientras que una de las muestras aprobó la evaluación ya que cumplió con los parámetros establecidos en el RTCA 11.03.56:09, ser la única muestra sanitariamente apta para su consumo.



2 Introducción

Durante mucho tiempo, se han utilizado las plantas medicinales para curar diferentes patologías, en forma de remedios caseros. Con el paso de los años y en la necesidad del hombre por mejorar su calidad de vida, ha logrado extraer los principios activos de las plantas y convertirlos en Fitofármacos siendo éstos, productos con una actividad suave y moderada, con márgenes terapéuticos relativamente amplios, que dan lugar a tratamientos menos agresivos. La contaminación microbiana puede reducir o eliminar el efecto terapéutico de los principios activos o causar infecciones inducidas por medicamentos contaminados. Los microorganismos presentes en medicamentos no solo los vuelven peligrosos desde el punto de vista infeccioso, además pueden cambiar las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de los medicamentos o cambiar el contenido de los ingredientes activos debido a que los microorganismos pueden convertir las drogas en productos tóxicos, llegando a ser un grave problema de salud pública.

En el presente trabajo investigativo se pretende realizar ensayos microbiológicos en los diferentes jarabes comercializado libremente en los centros naturistas en la ciudad de León. Aunque estos sean seguros también están expuestos a la contaminación bacteriana durante el almacenamiento y fabricación lo cual no garantiza a los consumidores estar exentos de patógenos. Por lo tanto, a través del estudio podremos proporcionar información a la población de la presencia o ausencia de microorganismos que podrían causarles muchos daños en la salud siendo algunos de ellos irreversibles, alertando por lo tanto a la población si los fitofármacos que se comercializan son seguros y confiables y que además de proporcionarle la mejoría en su salud no van a producirle una enfermedad diferente a la que presentaban, primeramente. Así como también le permitirá a la industria productora de estos medicamentos conocer si deben continuar con el nivel de exigencia actual o adicionar mejoras para obtener un producto de calidad. Ante esta situación se plantea la siguiente interrogante: ¿Cuál es la calidad Microbiológica que poseen los jarabes naturales comercializados en farmacias naturistas del departamento de león?



3 Hipótesis

Ho: Los fitofármacos verificados no cumplen con las especificaciones microbiológicas establecidas en el R.T.C.A 11.03.56.09 de productos farmacéuticos naturales.

Hi: Los fitofármacos verificados cumplen con las especificaciones microbiológicas establecidas en el R.T.C.A 11.03.56.09 de productos farmacéuticos naturales



4 Objetivos

4.1 Objetivo general

- Verificar la calidad microbiológica de fitofármacos en forma farmacéuticas líquidas (jarabes de uso oral) comercializados en farmacias naturistas del municipio de león. según RTCA 11.03.56.09 febrero – mayo. 2024

4.2 Objetivos específicos

- Determinar el contenido de BAM (bacterias aerobias mesófilas) por método de recuento en placa para formas farmacéuticas líquidas. según RTCA 11.03.56.09
- Verificar el contenido de hongos y levaduras. por método de recuento en placa para formas farmacéuticas líquidas. según RTCA 11.03.56.09
- Evaluar el contenido de bacterias patógenas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Pseudomona aeruginosa* para formas farmacéuticas líquidas. según RTCA 11.03.56.0



5 Marco teórico

5.1 Productos naturales de origen vegetal.

Históricamente, los productos de origen vegetal, particularmente las plantas medicinales y sus extractos, han pasado de tener un papel de supremacía en el arsenal terapéutico a un discreto segundo plano, para volver a tener, en las dos últimas décadas, una presencia cada vez mayor en la terapéutica. (Anderson, 2005).

Los remedios a partir de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas medicinales, todavía no se conocen muchos de los principios activos a los que deben las plantas sus extraordinarias cualidades. (Anderson, 2005).

De igual forma es importante recordar que la forma de recolección y conservación de las plantas, es clave, ya que, desde el mismo momento de la recolección, sufren un cierto número de transformaciones biológicas. Así al separar la parte aérea de la raíz, se provoca una interrupción del flujo alimenticio y de transpiración. Las enzimas que contiene, y que antes favorecían la formación de materias activas, empiezan ahora a descomponerla. En el organismo vegetal, las anteriores reacciones de síntesis orgánica, comienzan a ser suplantadas por reacciones de degradación, y el producto se transforma desde el punto de vista químico. Estas transformaciones se manifiestan con emisión de olor, modificación del color, etc. Una incorrecta recolección y desecación, aumenta la cantidad de productos de degradación, perdiendo la planta parte de su calidad. (Alonso, 1998).



5.2 La calidad de un extracto vegetal.

La calidad de un principio activo químico-sintético está bien definida, no es así en el caso de los extractos vegetales. Existen muchos grados de calidad del principio activo y con frecuencia es difícil determinar dicha calidad. (Aguilera Gallardo, S.E. 2012).

5.3 Los controles de calidad

La OMS recomienda que se establezcan criterios científicos y métodos que aseguren la calidad y eficacia de las preparaciones obtenidas a partir de plantas medicinales. Para la industria farmacéutica las plantas medicinales son una fuente de nuevas moléculas con efectos farmacológicos, que son utilizables directamente y que permiten obtener productos farmacéuticos con menores efectos secundarios. La utilización tradicional de plantas medicinales, sumada a los avances en tecnología, ha permitido generar diversos productos de calidad uniforme, eficaces y seguros (Vogel Hermine. 2003).

La preocupación de fabricantes y consumidores en general sobre los temas de calidad se ha incrementado. Especialmente a partir de los años 80 cuando se ha desarrollado la concienciación de la calidad a todos los niveles de la sociedad, de manera que hoy en día la calidad de los productos farmacéuticos y alimenticios, es más que un deseo, una necesidad. Actualmente un indicador de producto bueno e inocuo es la incorporación de sistemas de calidad contrastados, que sean capaces de generar confianza en el consumidor (19).

Controlar la calidad es el proceso a través del cual podemos medir la calidad real, compararla con las normas existentes y actuar sobre las diferencias. El primer paso importante para la planificación de la calidad, es la redacción de las especificaciones de calidad para cada producto. (Rios Colque, K.R. Riquez Alvaro, I.K. 2007). factores que determinan la calidad de un extracto vegetal son: (Aguilera Gallardo, S.E. 2012).



5.4 Calidad microbiológica

En la producción de fitofármacos se aplica el concepto de control de calidad integral que corresponde al conjunto de procedimientos que se deben considerar en su fabricación, que incluye desde la recepción de la materia prima hasta el material de envase, siguiendo el flujo de fabricación de acuerdo a lo establecido por las normas de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Es así como el control de calidad se debe aplicar en las etapas de recepción de materias primas y envases, manufactura, en producto intermedio, en producto terminado, en almacenamiento y distribución (Vogel Hermine. 2003).

El control microbiológico de los fitofármacos refleja la calidad de los productos naturales ya que para considerarse aptos para el consumo humano debe cumplir con las especificaciones microbiológicas establecidas, de ahí la importancia que estos productos lleguen a la población con un control adecuado que garantice su inocuidad. (Rios Colque, K.R. Riquez Alvaro, I.K. 2007).

La presencia de microorganismos en los productos naturales se debe a la infiltración de microbios de diversas maneras:

- Por transferencia de la carga microbiana de la materia prima.
- Por transferencia de la carga microbiana de los equipos empleados en el proceso de manufactura.
- Por contacto entre el producto terminado y sus contenedores
- Por las condiciones de almacenamiento (Vogel Hermine. 2003).

Contaminación microbiana por la materia prima: Los insumos que provienen de origen vegetal son recolectados en el campo, por lo que suelen presentar alta contaminación de microorganismos, los propios de la planta y del suelo, y los del medio ambiente en que se desarrollan: polvo, insectos, hongos, materias fecales de animales, pesticidas, también el empleo de agua no apta microbiológicamente o contaminada con metales pesados como Pb, Mn, Ni, Cr, etc, componen la fuente de contaminación de las mismas (Acosta de la Luz, L. A. 2002).



Ahora bien, como dicho material vegetal constituye un sustrato apropiado y muchos de los microorganismos presentes son capaces de sobrevivir a los procesos de secado utilizados, resulta que de forma general su recuento microbiano es elevado, compuestos en un alto porcentaje por bacterias mesófilas aerobias, entre los que destacan las formadoras de esporas, lo que explica su supervivencia a pesar del proceso de secado. (Rios Colque, K.R. Riquez Alvaro, I.K. 2007).

Por tal motivo los problemas de contaminación y consecuentemente las pérdidas de materias primas vegetales han ido en aumento, por lo que la estrategia para solucionar dicha problemática debe tomar en consideración entre las soluciones propuestas la desinfección de las plantas mediante métodos aprobados por la OMS. Durante muchos años se han desarrollado métodos de desinfección química y más recientemente métodos físicos mediante la utilización de la energía de radiación de los rayos gamma que junto a otras técnicas de ionización constituyen un nuevo procedimiento con gran diversidad de aplicaciones industriales, especialmente en la industria de fitofármacos (Acosta de la Luz, L. A. 2002).

La desinfección química puede ser con sales clorinadas como el hipoclorito de sodio o de calcio, para la reducción de la población microbiana se emplean dosis mínimas, entre 0,5 – 2,0% y el tiempo de inmersión es también breve, entre 5 y 10 minutos. Es de destacar que se prefiere la sal de sodio por ser más soluble que la de calcio, la que deja en la droga una capa blancuzca, que le proporciona un aspecto no adecuado (Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2000). Previa a la desinfección se requiere del lavado del material, lo que consiste en lavarlo con abundante agua potable, es decir, agua que debe reunir las condiciones químicas y microbiológicas adecuadas para que la misma no constituya una vía de contaminación (Acosta de la Luz, L. A. 2002).

La desinfección física viene a estar dada por la ionización, utilizando la energía de radiación de los rayos gamma, es una tecnología simple y segura. Consiste en que los productos envasados o a granel pasan a través de un campo de radiación dentro de una cámara de irradiación, a una velocidad controlada para asegurar la correcta



cantidad de energía y está basada en que inhibe muy eficientemente la síntesis del ADN en las células viables de las poblaciones microbianas.

Es de destacar que estas fuentes no convierten el material en radioactivo, no existe transferencia de calor al producto lo que constituye una gran ventaja en el caso droga vegetal termosensible, no deja residuos, es inocuo y no contamina el medio ambiente. El tiempo de exposición es el que determina la dosis de ionización absorbida, por lo que resulta un proceso de fácil control para asegurar su confiabilidad y repetitividad (Acosta de la Luz, L. A. 2002).

Por lo tanto, en la fabricación de los diversos productos es necesario asegurar que la materia prima utilizada no presente contenido microbiano o en su defecto que cumpla con las especificaciones permisibles. (Rios Colque, K.R. Riquez Alvaro, I.K. 2007).

Contaminación microbiana por el equipo: Los equipos usados deben ser sometidos a una sanitización rigurosa para poder erradicar la presencia de cualquier tipo de microorganismo, esta contaminación se puede deber a encapsuladoras, tableteadoras, tanques que se usan en los diversos procesos de manufactura (Vogel Hermine. 2003).

Contaminación microbiana por el envase: En el proceso de envasado es necesario asegurarse que los envases no presenten carga microbiana, aún cuando el proceso de manufactura se haya realizado de forma aséptica un envase contaminado es una gran fuente de contaminación. Por lo que es necesario someter a controles microbiológicos a todo material dispuesto a ser usado para el envasado de los productos (Vogel Hermine. 2003).

Contaminación microbiana por las condiciones de almacenamiento: El producto terminado debe almacenarse en condiciones óptimas de temperatura y humedad controlada (Vogel Hermine. 2003).



5.5 Microorganismos mesófilos aerobios.

Los mesófilos aerobios son microorganismos capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno libre, a la presión ordinaria y a una temperatura comprendida entre 15°C y 45°C, siendo el rango de temperatura óptima de crecimiento de entre 30°C y 40°C. 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 Cartagena, M.P. 2018).

Un recuento elevado de estos microorganismos podría significar, entre otros motivos, la excesiva contaminación de la materia prima, deficiente manipulación durante el proceso de elaboración, la alteración del producto, etc. (Cáceres Cartagena, M.P. 2018).

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos estima la carga microbiana total, sin especificar los tipos de microorganismo. Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos, así como un recuento elevado no implica presencia de flora patógena. (Cáceres Cartagena, M.P. 2018).

5.6 Microorganismos patógenos.

Un patógeno se define como un organismo que tiene la capacidad de causar enfermedad. Esa capacidad depende de diversos factores, que incluyen la dosis, la puerta de entrada al organismo y especialmente la susceptibilidad del huésped. Las bacterias patógenas deben esta capacidad a ciertas características o atributos de virulencia. Cuando los mecanismos de defensa del huésped se hallan comprometidos o totalmente suprimidos ciertos microorganismos considerados no patógenos pueden causar enfermedades que se denominan infecciones oportunistas, incluso, en ciertas circunstancias, el agente de la enfermedad puede provenir de la propia flora microbiana normal del paciente. (Cáceres Cartagena, M.P. 2018)



5.7 Las especies de bacterias patógenas de importancia son:

5.7.1 Escherichia coli:

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae o bacterias entéricas. Es un bacilo Gram negativo que forma parte de la microflora del tracto intestinal del hombre y de algunos animales. Son células cilíndricas, de 1.1-1.5 x 2.0-6.0 μm , que pueden presentarse individuales o en pares. Aeróbicas o aeróbicas facultativas, con tipo de metabolismo respiratorio y fermentativo. Produce ácido y gas de la mayoría de carbohidratos. Es oxidasa negativa y fermenta la lactosa. Usualmente, no produce ácido sulfhídrico (Gudiño, R. 2013).

La mayoría de cepas de E. coli son inofensivas, sin embargo, existen cepas capaces de producir un amplio espectro de enfermedades, entre ellas infección urinaria, septicemia, meningitis o enfermedad diarreica. Sólo algunas cepas de E. coli son agentes etiológicos de infecciones gastrointestinales. Estas cepas patógenas entéricas se diferencian entre si y de las no patógenas por su biotipo, generalmente asociado a la presencia de plásmidos (Gudiño, R. 2013).

Las cepas de E. coli se clasifican en los siguientes seis patotipos según sus características clínicas y epidemiológicas, y los factores específicos que determinan su virulencia: E. coli enteropatógena (ECEP), E. coli enterohemorrágica (ECEH), E. coli enterotoxigénica (ECET), E. coli enteroinvasiva (ECEI), E. coli enteroagregativa (ECEAgg) y E. coli de adherencia difusa (ECAD) (Michelli, E. et al., 2016). ECET causa la diarrea del viajero. ECEH causa una diarrea hemorrágica y a veces puede causar insuficiencia renal y hasta la muerte. Estos problemas tienen más probabilidades de ocurrir en niños y en adultos con sistemas inmunológicos debilitados (Andrade, A. Valdivieso, A. 2012).

La E. coli es patógeno indicador de contaminación fecal. Indica manejo inadecuado, falta de equipo personal de bioseguridad en el proceso de elaboración del producto y/o deficiencia en la esterilidad de la materia prima (Andrade, A. Valdivieso, A. 2012)



5.7.2 **Staphylococcus aureus**

Es una bacteria esférica (coco) Gram-positiva de 0.5 a 1.5 μm de diámetro que puede encontrarse agrupada en pares, en cadenas cortas o en grupos en forma de racimos de uva que puede encontrarse agrupada en pares. No tiene movilidad y no forma esporas, es anaerobia facultativa y de metabolismo fermentativo. Taxonómicamente el género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Staphylococcaceae*. Las colonias habitualmente son opacas y de color blanco o crema, a veces, amarilla a naranjas. Es catalasa positiva, oxidasa negativa y con frecuencia reduce el nitrato y a nitrito. Crece en medios con 10% de cloruro de sodio. La temperatura óptima de crecimiento es 30 –37°C (Gudiño, R. 2013), sin embargo, puede llegar a desarrollarse en temperaturas de entre 15-45°C. La mayoría de cepas son coagulasa-positiva (Andrade, A. Valdivieso, A. 2012). Es una especie muy sensible a la acción del calor y de los desinfectantes (Torres, M.2006).

Normalmente vive en la piel y además en los pasajes nasales sin causar daño, pero pueden causar infección cuando penetran la piel a través de un corte o una úlcera, o cuando dichas bacterias ingresan al cuerpo a través de un catéter o un tubo de respiración. (Cáceres Cartagena, M.P. 2018).

Casi todas las cepas de *S. aureus* producen un grupo de enzimas y citotoxinas. Dentro de estas hay cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa. La función principal de estas proteínas es ayudar a degradar los tejidos locales para convertirlos en nutrientes para las bacterias (Bustos, J. et al., 2006).

El *Staphylococcus aureus* causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis. Es causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales. (Cáceres Cartagena, M.P. 2018).

Provoca intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome del shock tóxico al liberar súper antígenos en el torrente sanguíneo. Además, causa septicemia, impétigo y fiebres (Bustos, J. et al., 2006).



La mayoría de las infecciones por *Staphylococcus aureus* se presentan en personas con sistemas inmunitarios débiles, generalmente pacientes que se encuentran en hospitales y se propaga mediante el contacto directo con una persona infectada, tocando superficies o elementos contaminados con la bacteria o compartiendo objetos personales que hayan tocado la piel infectada. (Cáceres Cartagena, M.P. 2018).

Las infecciones por *S. aureus* resistente a meticilina son conocidas como infección por MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) un tipo de bacteria potencialmente peligrosa que es resistente a ciertos antibióticos, puede causar infecciones de la piel y de otro tipo y está relacionada con cuidados médicos o

intrahospitalaria, de ahí sus siglas HA-MRSA (Hospital-acquired or health care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Las personas que han sido hospitalizadas o que se han sometido a una cirugía dentro del último año tienen un alto riesgo de padecer esta afección, al igual que las personas que reciben ciertos tratamientos, tales como diálisis (Andrade, A. Valdivieso, A. 2012).

La prevalencia de estas cepas en la comunidad se ha incrementado sustancialmente. Si no se toman las medidas adecuadas para entender y controlar la cambiante epidemiología y sintomatología clínica, puede convertirse en un importante problema de salud en un futuro cercano (Bustos, J. et al., 2006).

La presencia de *S. aureus* en el producto terminado indica un manejo inadecuado en el proceso de elaboración del producto y una incorrecta manipulación del personal involucrado. (Cáceres Cartagena, M.P. 2018).



5.7.3 Pseudomonas aeruginosa:

Este patógeno es procedente de suelo, agua, plantas y animales. *P. aeruginosa* son células planas o ligeramente curvadas, de 0.5 –1.0x 1.5 –5.0 µm. Es una bacteria Gram negativa de motilidad unipolar, se la encuentra en pares y ocasionalmente encadenas cortas. Es aerobio obligado y oxidasa positiva. Crece a temperaturas óptimas de entre 37°C a 42°C; sin embargo, su crecimiento a 42°C ayuda a diferenciarla de otras especies de *Pseudomonas* en el grupo fluorescente (Andrade, A. Valdivieso, A. 2012).

Forma colonias redondas y lisas de color verde fluorescente. Con frecuencia produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente que difunde en agar.

Muchas cepas también producen pioverdina, el pigmento fluorescente que confiere color verdoso al agar. Algunas cepas producen pioverdina, pigmento rojo oscuro piorrubina o piomelanina, pigmento negro. No fermenta los carbohidratos, pero muchas cepas oxidan la glucosa (Andrade, A. Valdivieso, A. 2012).

Es nutricionalmente versátil, no requiere de factores de crecimiento orgánicos (Torres, M. 2006), por esta razón, no requiere medios enriquecidos para crecer y puede sobrevivir y multiplicarse en límites amplios de temperatura en casi cualquier ambiente, incluso aunque éste se caracterice por un contenido elevado de sal (Gudiño, R. 2013).

Este patógeno oportunista de individuos inmunocomprometidos, infecta el tracto pulmonar, el urinario, tejidos, heridas, y es el causante de otras enfermedades en la sangre. También es causante de dermatitis, originada por disminución del control de la calidad del agua de uso doméstico (Gudiño, R. 2013)

La *P. aeruginosa* es patógena cuando se introduce en mucosas y piel lesionadas por daño tisular directo o cuando hay neutropenia, como en la quimioterapia contra el cáncer (Andrade, A. Valdivieso, A. 2012).

Produce infección en heridas y quemaduras formando pus de color azul verdoso. Cuando se introduce por punción lumbar causa meningitis, cuando la vía de entrada son catéteres, instrumentos o soluciones irrigantes causa infección del aparato



urinario. La afección del aparato respiratorio, en especial por aparatos respiradores contaminados, produce neumonía necrosante. Esta bacteria se observa con frecuencia en la otitis externa leve de los nadadores y en pacientes diabéticos puede producir otitis externa invasora (maligna). (Cáceres Cartagena, M.P. 2018).

La *P. aeruginosa* y otras bacterias Gram negativas pueden colonizar los sistemas de purificación de agua por la formación de biofilms. Los Biofilms (o biopelículas) son masas de microorganismos vivos o muertos que se acumulan dentro de los reservorios de agua, cañerías u otras superficies inertes como acero inoxidable de equipos y mesas. Otros organismos o materiales pueden ser atrapados en las láminas del biofilm, incluyendo nemátodos, algas, bacterias, hongos y depósitos minerales. Estas estructuras una vez formadas son muy difíciles de remover con el uso de agentes sanitizantes (Cerra, H. et al., 2013).

La presencia de este patógeno indica un manejo inadecuado en el proceso de elaboración del producto y deficiencia en la asepsia de la materia prima, así como deficiencias en los conductos de entrada de agua para proceso. (Andrade, A. Valdivieso, A. 2012),

5.7.4 Salmonella sp:

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, se diferencian de otras bacterias de esta familia por reacciones bioquímicas y serológicas. Algunos serotipos son más virulentos que otros. (Torres Ipanama, G.P. Reátegui Caiña, A.I. 2013).

Son bacterias Gram negativo, anaerobias facultativas, no forman esporas, fermentan la glucosa con producción de gas, pero no la lactosa. Producen una infección alimentaria denominada salmonelosis, la cual es consecuencia de la ingestión de células vivas de este género. Los síntomas son náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea. La epidemiología es muy compleja, por lo que resulta difícil en la práctica establecer los métodos adecuados para el control. (Torres Ipanama, G.P. Reátegui Caiña, A.I. 2013).



El origen de la contaminación de los productos de consumo por *Salmonella* es doble: Estos productos pueden contener el microorganismo originalmente, origen endógeno, como consecuencia de que los animales productores tenían salmonelosis o eran portadores sanos de salmonellas. Además, hay que tener en cuenta una contaminación de origen exógeno, de los productos libre de salmonellas, a partir de los manipuladores, utensilios, heces, ingredientes. O en el caso de alimentos de origen vegetal, pueden contaminarse por la utilización de abonos orgánicos o por el riego con aguas contaminadas. (Torres Ipanama, G.P.Reátegui Caiña, A.I. 2013).

5.8 Hongos y levaduras:

En el campo de la microbiología industrial se estudia tanto la acción nociva de los hongos en los alimentos y productos manufacturados, como el empleo de estos organismos en fermentaciones industriales en el campo de la biotecnología. Pertenecen a grupos taxonómicos muy diversos, aunque se pueden observar a simple vista, estos producen estructuras diminutas, reproductoras y vegetativas, que no es posible estudiar sin la ayuda del microscopio. Comúnmente se da el nombre de moho a ciertos hongos multicelulares filamentosos, dotados de un micelio verdadero y cuyo crecimiento en los alimentos se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. Por esta razón, no es seguro establecer el límite entre los hongos y ciertos organismos productores de esporas y de micelio de las levaduras (Pascual, 2000).

Las levaduras son hongos que crecen generalmente en forma de agregados sueltos de células independientes, que pueden ser globosas, ovoides, piriformes, alargadas o casi cilíndricas. En algunos casos, forman cadenas de células alargadas adheridas de modo suelto, semejantes a un micelio, por lo que se las denomina pseudomicelio. Algunas especies forman breves extensiones de verdadero micelio, con frecuencia ramificado. De acuerdo con lo expuesto, según se ha comentado, no existe un límite de separación definido entre las levaduras y otros hongos que forman un micelio típico (Pascual, 2000). Las levaduras, cuando crecen sobre medios sólidos, forman colonias de aspecto característico que recuerda a las colonias bacterianas. En casi todas las especies de interés industrial, la manera



general de reproducción vegetativa es por gemación. Muchas de ellas presentan reproducción sexual por medio de ascosporas, a diferencia de los hongos, las levaduras no pueden identificarse solamente por sus caracteres morfológicos; se precisa la ayuda de pruebas bioquímicas para la identificación específica (Pascual, 2000).

5.9 Jarabes:

Los jarabes son preparaciones acuosas, límpidas y de elevada viscosidad, que contienen un azúcar, generalmente sacarosa, en concentración similar a la de saturación. (Vila Jato, J. 2008)

El azúcar ejerce una acción conservante, edulcorante y viscosante. La alta concentración de azúcar le confiere al jarabe una elevada presión osmótica que impide el desarrollo fúngico y bacteriano. La mayoría de los jarabes se formulan con una concentración de azúcar cercana, pero inferior a la de saturación, y se añaden agentes conservantes que previenen la proliferación de microorganismos y aseguran su estabilidad durante el período de almacenamiento y utilización. (Vila Jato, J. 2008)

Dentro de los componentes de los jarabes están: azúcares, agua, conservantes, codisolventes, saborizantes, colorantes. (Vila Jato, J. 2008)

El fitofármaco es un medicamento extraído de una planta medicinal. El término proviene del griego phytos = planta y pharmakon = remedio. Aunque el extracto obtenido de una especie vegetal se compone de toda una serie de principios activos, este es considerado como un solo fármaco, ya que su efecto radica en la acción combinada de sus componentes. (Kohler, P. 1999)



5.10 Control Microbiológico

Para alcanzar la calidad microbiológica es necesario aplicar pasos ordenados a través de la cadena de producción. A lo largo de esta cadena se pueden presentar una serie de inconvenientes que pueden llevar a obtener un producto o productos que tengan características muy distintas a las esperadas, tanto para el consumidor final como para la empresa. Por esta razón, para garantizar la calidad es importante tener en cuenta que este se basara en el control de la presencia y la multiplicación de los microorganismos ya que factores como el sustrato proporcionado por el producto, el tipo de ambiente, temperatura, humedad relativa entre otros pueden ocasionar su presencia.

Los problemas microbiológicos suelen presentarse cuando no se alcanza el efecto deseado durante el proceso o por los sistemas de conservación que se tengan, y esto suele ser consecuencia de errores en la manipulación o procesado. La detección de dichos errores, su rápida corrección y prevención, son el principal objetivo de cualquier sistema de control microbiológico. (Torres, 2006).

5.11 Importancia del control microbiológico.

La Revolución Industrial supuso una profunda transformación en la economía y la sociedad. Los cambios originados más inmediatos se produjeron en los procesos de producción: qué, cómo y dónde se producía. Esto condujo a que se tuvieran que extremar las precauciones, para evitar microorganismos perjudiciales en los alimentos y su conservación como también en el agua. (Forsythe, 2002).

En todo Control Microbiológico de calidad se destacan dos aspectos:

Calidad Higiénica - Sanitaria: que no se distribuyan microorganismos patógenos para la salud.

Calidad Comercial: presencia de microorganismos, que alteren el producto haciéndolo no comestible (aunque no sean patógenos). (Forsythe, 2002).



La pérdida de calidad de un producto, por tanto, puede ser debido a la presencia de microorganismos patógenos o de microorganismos que alteran el producto de tal manera que lo convierten en no apto para el consumo. Por esto que surge la necesidad de que todas las industrias, se capaciten y conozcan sobre la importancia que adquiere la calidad microbiológica de sus productos, a nivel de las materias primas que usan, que conozcan la calidad de todos los procesos de elaboración y por supuesto la calidad del producto final. (Forsythe, 2002).

La vida útil es muy importante y su valoración es extremadamente difícil, tanto por su subestimación como por la sobreestimación. La subestimación se refiere a una pérdida económica por disminuir el tiempo de permanencia en el mercado y la sobreestimación es la pérdida de seguridad higiénico-sanitaria (también pérdidas económicas, porque se deja de comprar el producto si este no cumple los requisitos adecuados). (Forsythe, 2002).

En Microbiología, el objetivo principal es garantizar productos saludables e inocuos y evitar el deterioro microbiológico de los mismos. Para obtener información acerca de la calidad microbiológica de un producto es necesario llevar a cabo análisis microbiológicos que permitan determinar la presencia de los mismos. Por eso, hay un gran número de técnicas para establecer esa calidad microbiológica. (Forsythe, 2002). Para ello es importante tener en cuenta los siguientes aspectos: El significado de los grupos y especies de microorganismos presentes.

Normas y especificaciones microbiológicas que deben cumplir los productos: es decir, disponer de patrones de comparación para saber si las cantidades de microorganismos presentes en un producto son normales o no. (Forsythe, 2002).

Planes y programa de muestreos

El proceso en la toma de muestras tiene como objetivo fundamental, obtener una muestra representativa de un determinado lote o producto. La información suministrada también determina las características microbiológicas del producto que son útiles para su aceptación o rechazo.



Posterior al análisis de las muestras, los resultados que se obtengan se compararán con los criterios que permitirán aceptar o rechazar el lote evaluado. (Vélez, 2005). La elección de un plan o programa de muestreo adecuado, se diseña de tal manera que se pueda tener un criterio de decisión frente al lote o los lotes evaluados y si estos cumplen o no las normas microbiológicas vigentes para dichos productos. (Torres, 2006).

En teoría, los criterios de decisión se establecen de modo que se aceptan los lotes de calidad deseada y se rechacen aquellos que no la tienen. Es importante tener en cuenta que al no examinar el lote completo existe el riesgo de no aceptar aquel producto o productos óptimos o de aceptar aquel o aquellos que no cumplan con la calidad esperada, por esto hay que tener conocimiento del riesgo que acompaña a cada plan de muestreo. (Torres, 2006).

El tener un número de muestras representativas que se puedan examinar, menor es el riesgo de tomar una decisión equivocada, pero más muestras suponen un mayor número de análisis, un muestreo más engorroso, más costoso y una mayor pérdida de producto, por lo que hay que llegar a un acuerdo entre el plan de muestreo que se escoja y el grado de riesgo que es aceptable. (Torres, 2006)



6 Diseño metodológico

6.1 Tipo de estudio: Experimental descriptivo.

6.2 Área de estudio: Laboratorio de microbiología de la carrera de farmacia, área de conocimiento de ciencias química, UNAN-león.

6.3 Universo de estudio: Formas farmacéuticas líquidas (Jarabes), comercializados en farmacias botánicas y/o naturistas del municipio de león.

6.4 Criterios de exclusión:

- Forma farmacéutica (semi sólidos y solidos).
- Fitofármacos con edulcorantes naturales o artificiales.
- Con registro sanitario.
- Dificultad de ser asequible.
- Baja rotación de venta del producto
- Presentación no mayor a los 240 ml. Mínimo de tres unidades de al menos un lote Comercialización en otros departamentos.

6.5 Criterios de inclusión:

- Forma farmacéutica líquidas (jarabes).
- Fitofármacos sin edulcorantes naturales o artificiales.
- Sin registro sanitario.
- Fácil asequibilidad.
- Alta rotación de venta del producto
- Presentación de 240 ml o menos.
- Mas de tres unidades de al menos un lote
- Comercialización en el departamento de león.



6.6 Muestras:

Siete presentaciones, jarabes, frasco PET, color blanco perlado, tapa rosca PET, color blanco perlado, frasco de 240 ml , muestras asequibles, no menos de tres unidades de cada muestra.

Unidad de análisis: jarabe

6.7 Variables de estudio: UFC

- Recuento
- ml
- BAM (Bacterias aerobias mesófilas)
- Levaduras
- Hongos

Tabla No 1 Operacionalización de las variables de estudio.

Variable	Definición	Tipo variable	Unidad de medición
UFC	En microbiología, la unidad formadora de colonias es una unidad de medida que se emplea para la cuantificación de microorganismos, es decir, para contabilizar el número de bacterias o células viables en una muestra de interés	Cuantitativa	Colonia
Recuentos	Los recuentos determinan el número de células microbianas, por observación directa en el microscopio.	Cuantitativa	UFC/ml



bacterias y aerobias mesófilas	La palabra mesófilos significa que son afines a temperatura media (30- 37°C) y la palabra aerobios que son dependientes de oxígeno	Cuantitativa	UFC/ml
Hongos	Los hongos (moho) son organismos microscópicos que viven en la materia animal o vegetal. Ayudan en la descomposición de la materia muerta y a reciclar los nutrientes en el medio ambiente.	Cuantitativa	UFC/gr
Levaduras	La levadura son hongos unicelulares, muy pequeños, que, para poder observarlos en detalle, necesitamos de un microscopio. Estos microorganismos son muy abundantes en la naturaleza y se encuentran tanto el suelo, en las plantas (semillas, frutas, flores, etc.), como en el intestino de los animales.	Cuantitativa	UFC/gr

6.8 Interacciones más frecuentes de variables

- Bacterias-UFC
- Hongos-UFC
- Levaduras-UFC



7 Procedimiento.

7.1 Parte experimental.

7.1.1 Desarrollo de la investigación.

El proceso de la investigación se inició con la identificación del problema, luego determinamos si era real, factible, relevante, resoluble, generador de conocimientos. Posteriormente se planteó y delimito el problema, a su vez, la valoración y formulación del mismo. Después se procedió a la búsqueda de información utilizando diferentes fuentes bibliográficas para ello se consultó en libros, artículos científicos, manuales como RTC11.03.56.09, monografías universitarias de la UNAN-león, tesis de título UNAN-LEON y algunas bases de datos. A continuación, se planteó la hipótesis y seguidamente se desarrolló la parte experimental.

7.1.2 procedimiento para la adquisición de la muestra

Para la adquisición de la muestra visitamos a diferentes centros naturista en el municipio de león, Dado a que hoy en día se encuentran muchos centros naturistas en los cuales comercializan productos sin registros sanitario y al ser uno de los municipio con mayor auge de consumo y ventas de Fito medicamentos, posteriormente se procedió a la gestión de compra en dicho departamento considerando los puntos de mayor afluencia por parte de la población (mercados), para cumplir con el requisito de inclusión como era productos fitomedicinales en presentación farmacéutica liquidas (jarabe), de mayor venta a nivel nacional, que no cumplan con reglamento fitosanitario de registro.

Procedimiento para Determinación de Microorganismos

Recomendaciones Generales:

- Todas las muestras se analizaron bajo condiciones asépticas.
- El tiempo transcurrido desde la primera dilución hasta su incorporación en el medio de cultivo, no excedió de una hora.



- Antes de proceder a realizar el análisis microbiológico los envases que contienen la muestra, se limpiaron con algodón y alcohol de 70% , y se esperó a que seque el envase para luego iniciar el trabajo.

7.1.3 Esterilización

La esterilización es la muerte y/ o eliminación de todo microorganismo. No existen grados de esterilidad, un objeto es estéril o no lo es. La dinámica de la esterilización dice que la proporción de microorganismos muertos en iguales periodos de tiempo es constante. A mayor temperatura, mayor acción y menos tiempo necesario para esterilizar. Esto es válido para cualquier procedimiento químico o físico excepto filtración.

A) Calor: Actúa por desnaturalización de proteínas y contribuye a la fusión de lípidos de membranas.

B) Calor húmedo: la desnaturalización y coagulación se facilita en presencia de agua pues se rompen los puentes de hidrógeno entre los grupos $C = O \cdots \cdots HN$ que constituye la estructura secundaria y se agrega (también mediante puente de hidrógeno) una molécula de agua a cada extremo de esas uniones rotas. Las proteínas en soluciones más diluidas coagulan a menor temperatura que las concentradas. Esterilizar exclusivamente en calor húmedo: medios de cultivos, recipientes contaminados, material de goma, y todo elemento que no resista las altas temperaturas del calor seco. La autoclave utiliza vapor a presión superior a la normal. Así, la temperatura del vapor de agua asciende a $121^{\circ}C$. El vapor saturado penetra en los recipientes tomando contacto con los microorganismos a destruir, allí se condensa liberando calor. El calentamiento es rápido por la gran cantidad de calor latente del vapor de agua, que libera al condensarse sobre la superficie del objeto.

C) Calor seco: Deshidrata las bacterias, virus, etc. y facilita la coagulación o desnaturalización de las proteínas. Se requieren mayores temperaturas para producir daño irreversible (muerte). Se acepta que el calor seco actúe oxidando los constituyentes intracelulares.



En el proceso de esterilización son prioritarios los procesos oxidativos y de fusión de membranas por sobre la desnaturalización. Resulta lento por la menor eficacia del calor seco y por la lentitud del transporte del calor (convección y radiación).

7.1.4 Preparación de la cristalería

En los procedimientos microbiológicos es frecuente el empleo de material de vidrio y dado que éste tiene una gran influencia en la calidad de los resultados, es muy importante tomar en cuenta su adecuada limpieza y esterilización, es decir, se debe prestar un especial cuidado a su preparación.

Esterilización de cristalería vía seca.

Placas de Petri: Empacamos en papel aluminio de 5 en 5, introducimos la fecha, nombre del instrumento y posteriormente indicamos que es para análisis.

Pipeta: Se le coloco algodón en la parte de accionamiento como protector o como filtro de protección, luego se procedió a empacar con papel aluminio de 3 en 3, agregamos la capacidad, fecha y marcamos con una flecha el punto de apertura.

Erlenmeyer: Como primer paso se realizo un tapón con algodón y papel aluminio, luego añadimos una retapa con papel aluminio para luego ser sometido a esterilizar.

Tubos de ensayos: Colocamos un tapón de algodón y papel aluminio en el caso de que este no sea tubo de ensayo de rosca, luego los introducimos en un beaker y añadimos una retapa de papel aluminio para luego ser sometido a esterilizar. Una vez listo todo nuestros instrumento los sometemos a un horno, lo llevamos a una escala de 7 y procedemos a llevarlos a una temperatura de 180 °c por un tiempo de 2 horas .



Esterilización por vía húmeda

Placas de Petri: Empacamos en papel aluminio de 5 en 5, introducimos la fecha, nombre del instrumento, y posteriormente que es para análisis.

Pipeta: Introducimos algodón en la parte de accionamiento como protector o como filtro de protección, luego procedimos a empacar con papel aluminio de 3 en 3 , agregamos la capacidad , fecha y marcamos con una flecha el punto de apertura .

Erlenmeyer: Como primer paso realizamos un tapón con algodón y papel aluminio, luego añadimos una retapa con papel aluminio para luego ser sometido a esterilizar.

Tubos de ensayos: Se confecciona en tapón de algodón y se cubrió con un capuchón de papel aluminio, luego se introdujo en un beaker y añadimos una retapa de papel aluminio para luego ser sometido a esterilizar.

Agregamos un nivel de agua considerado al autoclave, luego se sometió los instrumento ya empacados y procedimos a tapar el autoclave. Lo llevaremos a una temperatura de 121°C por un tiempo de 30 min.

Una vez terminado los 30min retiramos nuestra cristalería se procede a lavar con agua clorada y se introduce a un recipiente con detergente y se deja reposar por el tiempo de 24 horas, una vez cumplida la 24 horas retiramos nuestra cristalería y introducimos en otro recipiente con agua destilada por un tiempo de 24 horas, repetimos este proceso simultáneamente en un periodo de 3 días más , para luego retirar nuestra cristalería y pasar a su posterior secado.

7.1.5 Esterilización de la ropa

Como primer paso empacamos nuestra gabacha en papel aluminio, la dejamos hermética y luego la sometemos a una autoclave a una temperatura de 121°C por un tiempo de 15 minutos.



7.1.6 Esterilizar ambiente

Procedimiento de descontaminación en las áreas del laboratorio b-13

1. Primero se seleccionó los puntos críticos o focos que se contaminan más en el área.

a. Punto crítico No. 1: cerca de las puertas de entradas y salidas, se coloca un fondo de una placa Petri y se le adiciona doce (12) ml de formaldehído y luego se procede a adicionarle a la placa Petri siete (7) gramos de permanganato de potasio.

b. Puntos crítico No. 2: Mesas, se procede a colocar un fondo de una placa Petri y se le adiciona doce (12) ml de formaldehído y luego se procede a adicionarle a la placa Petri siete (7) gramos de permanganato de potasio.

c. Punto crítico No. 3: Ventanas, se coloca un fondo de una placa Petri y se le adiciona doce (12) ml de formaldehído y luego se procede a adicionarle a la placa Petri siete (7) gramos de permanganato de potasio,

d. Punto crítico No. 4: es la parte más alta del área, y se procede a poner un fondo de placa Petri y se adiciona doce (12 ml de formaldehído y luego se procede a adicionarle a la placa Petri siete (7) gramos de permanganato de potasio. Luego de realizado este proceso, se deja por tres días para que los gases emanados eliminen la carga microbiana de los ambientes contaminados. Estos desinfectantes se rotan las diferentes concentraciones en la semana para que tanto las bacterias esporas, hongos y levaduras, no se vuelvan resistentes a ellos (desinfectantes). En cada trabajo realizado se procede a hacer controles de los ambientes para valorar el índice de contaminación que se encuentre en un estado muy bajo de UFC/m³, de esta manera evitamos que nuestros ambientes de trabajo estén en alerta roja, encontrando más de 10 UFC/ m³, por ambiente.



Desinfección y Sanitización del Área de Microbiología:

Tipos de desinfectante que se utilizan

- Alcohol al 70%
- Hipoclorito al 0.5% Hipoclorito al 1.0% Hipoclorito al 2.0 %
- Formaldehído al 37%
- Permanganato de potasio

Equipo de protección que se le garantiza

- Guantes
- Boquillas Gorros
- Botas quirúrgicas
- Lentes

Desarrollo de la Sanitización:

Los desinfectantes en estas concentraciones los aplicamos en las mesas antes de trabajar y después de manipular cualquier ensayo o subcultivo realizado, usando limpiónes y algodón para aplicar la sanitización.

Dependiendo de la cantidad de todo tipo de bacterias, hongos y levaduras que se manipulan en los ambientes se realiza la descontaminación por desprendimiento de gases (químicos), si se manipula muchas bacterias, hongos y levaduras en el transcurso de la semana se procede a descontaminar al final de la semana (viernes), de lo contrario el proceso de descontaminación se realiza cada quince días, siempre variando las concentraciones o cantidades de gases emanados en los ambientes por la reacción química, esto con el objetivo de evitar la resistencia de las bacterias hongos, esporas y levaduras.

7.2 Preparación de medios de cultivos

1-Seleccionamos los medios de cultivos a preparar para nuestros ensayos microbiológicos



2- Respetamos los que nos indica la etiqueta del frasco del medio a cultivo a preparar:

- fecha de vencimientos
- Su PH optimo.
- Tiempo de esterilización y temperatura. (si se somete a autoclave o no.)
- Gramos litros a pesar.

3-En un balón aforado colocamos agua a ebullición.

4-Pesamos en papel aluminio en una balanza analítica los gramos litros a preparar para dicho ensayo.

5-Vaciamos a un Erlenmeyer la cantidad pesada del, medio de cultivo.

6-Con la ayuda de una probeta aforamos nuestro volumen requerido con agua destilada.

7-Posteriormente Procedimos a vaciar al Erlenmeyer donde está el medio, agitamos hasta disolver los grumos.

8-Medimos su PH y ajustamos si fuese necesario a lo que le indica la etiqueta.

9-Procedimos al Erlenmeyer a aplicarle tapa y retapa de aluminio.

10-Se procedió a esterilización por medio de autoclave o baño maría según lo que nos indica la etiqueta del medio cultivo.

7.3 Recuento De Organismos Mesófilos Aerobios

Método En Placa:

NOTA: En función del grado de contaminación esperado en el producto, efectuar las diluciones decimales que se estimen convenientes para que 1 ml contenga entre < 10 4UFC / g (mayor significado estadístico). Cuando no se tiene antecedentes al respecto es conveniente efectuar hasta la dilución 10³ y ampliar o reducir el número de diluciones en base a la experiencia.



Efectuar tres diluciones decimales:

Realizamos nuestro pool para obtener una mayor representatividad de nuestro lote de la muestra ante el ensayo microbiológico.

Primera dilución: se tomará 10 ml de muestra. Se añadió 90 ml del diluyente seleccionado contenido en un Erlenmeyer.

Segunda dilución: Transferimos 1 ml de la primera dilución a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de solución diluida de Fosfatos pH 7.2 (diluyente).

Tercera dilución: Transferimos 1 ml de la segunda dilución a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de solución diluida de Fosfatos pH 7.2 (diluyente).

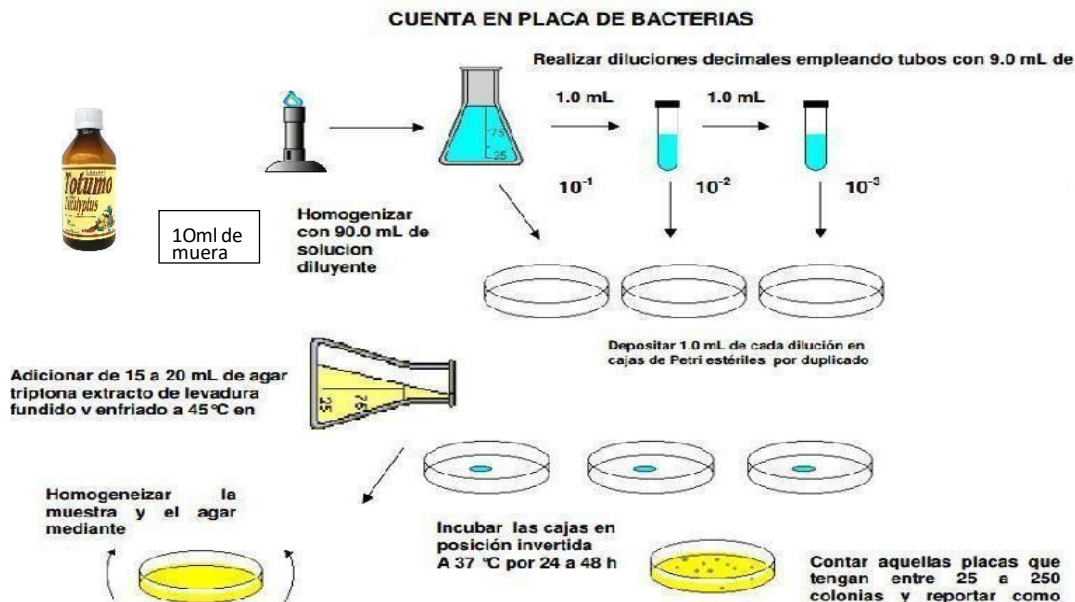
NOTA: Utilizar una pipeta única para cada dilución.

Simultáneamente inocular por duplicado 1 ml de cada dilución del producto en platos Petri, añadir a cada placa 15 –20 ml de medio Agar de caseína soja previamente esterilizado y mantenido en baño María a temperatura entre 45-48 oC (para mantenerlo fundido).

Con movimientos suaves rotatorios, mezclaremos la alícuota de la muestra con el medio de cultivo, evitando que se produzca un derrame. Permitir que el medio solidifique e incubar las placas en posición invertida a 35 oC - 37 oC , durante 48 – 72 horas.

Después del período de incubación contaremos el número de UFC con ayuda del contador de colonias. Determinaremos la media o promedio de UFC por cada dilución. Informaremos el número de UFC por gramo o por ml del producto, considerando el factor de dilución de la muestra.

El producto se aceptará si se observan UFC en cantidades menores de 104 UFC por ml de la muestra



7.4 Recuento De Hongos Filamentosos Y Levaduras

Se procederá igual como se indica en el recuento de organismos mesófilos aerobios, con la excepción que se utiliza el medio agar Sabouraud dextrosa incubar a 22 oc - 25 oc durante cinco a siete días.

Después del período de incubación contaremos el número de UFC existentes con ayuda del contador de colonias. Informaremos el número de UFC por ml de muestra, tomando en cuenta el factor de dilución de la muestra. El producto se acepta si hay ausencia de colonias o la cantidad existente es menor de 102 colonias por ml de muestra.

7.5 Determinación De Microorganismos Patógenos.

Para pre enriquecer nuestro 4 microorganismo patógenos utilizamos un frasco de disolución de 90ml de caldo digerido de caseína soja , adicionándole 10 ml de la muestra, luego pasamos a incubar a temperatura de 35-37°C durante un periodo de 18-24 horas, cumpliendo el periodo de incubación procedemos a sub cultivar a cada medio selectivo para cada patógeno.

7.5.1 Salmonella: Del caldo digerido de caseína soja añadimos 1ml a un tubo de ensayo que posee 9 ml de caldo rappa-port , luego pasamos a incubación a temperatura de 35-37 °C en un periodo de 18-24 horas.



Cumpliendo el periodo de incubación sub cultivamos al medio selectivo para salmonella XLD(xilosa,lisina,Desoxicolato) con la ayuda de una asa de platino .lo pasamos al periodo de incubación a 35-37 °C por un periodo de 24-48 horas .Cumpliendo su periodo establecido de incubación observamos si hay presencia de colonia con la característica de salmonella. El cual sus características es Colonia roja con o sin centro negro. Producto de H₂S (sulfuro de hidrógeno) confirmamos con prueba Imvic .

7.5.2 staphylococcus aureus: Del caldo digerido de caseína soja tomamos con la ayuda de una asa de platino una asada para posteriormente introducir a su medio selectivo agar Baird Parker una vez terminado pasamos a su periodo de incubación, a una temperatura de 35- 37 °C 24-48 horas .cumpliendo su periodo de incubación pasamos a su observación si tenemos presencia o ausencia, características pigmentación negra Con aló alrededor de la colonia para confirmar pasamos la prueba de coagulasa

7.5.3 Echerichia coli: Pre enriquecido el caldo digerido de caseína soja tomamos con una asa, sub cultivamos al agar selectivo agar macconkey y luego pasamos al periodo de incubación a una temperatura de 35-37°C por un periodo 24-48 horas.

Cumpliendo su periodo de incubación pasamos a revisar si hay presencia de escherichia coli con la característica de la colonia, el cual su pigmentación es de rosa ah rosado (color chicha) confirmamos con prueba IMVIC.

7.5.4 pseudomonas aeruginosa: Del caldo pre enriquecido de caseína soja tomamos con una asa de platino y sub cultivamos al medio de cultivo agar cetrimide, pasamos a su periodo de incubación a temperatura de 35-37°C por periodo de 24-48 horas . Cumpliendo su periodo de incubación pasamos a ver la característica de la colonia , colonia grande de un color verde musgo, en presencia de lámpara ultravioleta observamos fluorescencia , confirmamos con prueba de la oxidasa .

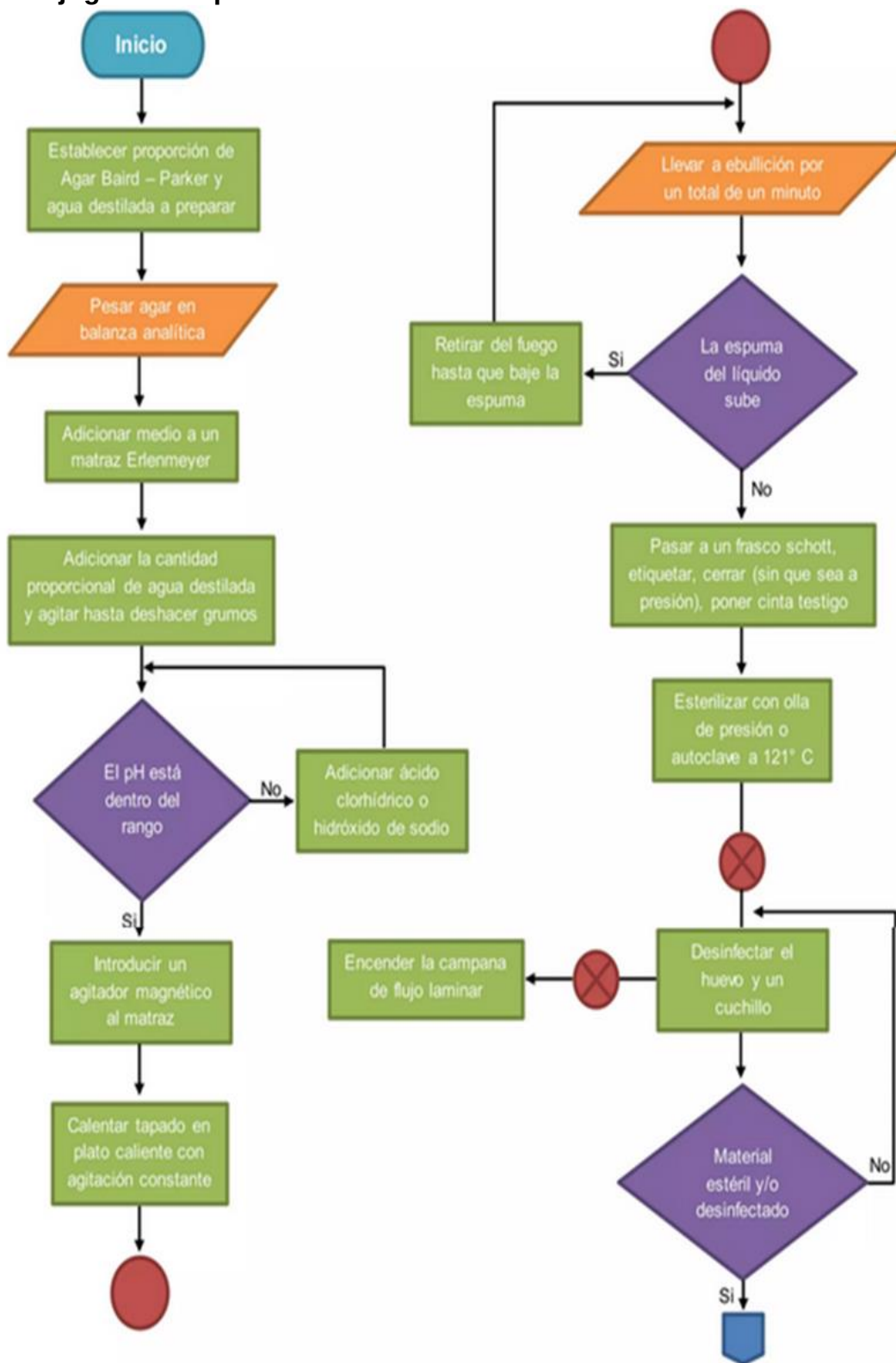


Tabla No 2. condiciones analíticas

microorganismo patogenos	medio de cultivo selectivo	periodo de incubacion y temperatura	morfologia colonial	pruebas de confirmacion	Morfología microscopia	PH
Pseudomonas aeruginosa	Agar cetrimida	36-37°C X 24-48 H	verdes azulosas	prueba de oxidasa	Bacilos gram negativos	7.2±0.2
Staphylococcus aureus	Agar baird parker	36-37°C X 24-48 H	Colonias negras lustrosas rodeadas de zonas claras	prueba de coagulasa	Cocos gram positivos	6.8± 0.2
Escherichia coli	Agar macconkey	36-37°C X 24-48 H	colonias grandes rosa-rosadas	IMVIC	Bacilos gram negativos	7.1 ±0.2
Salmonella	Agar XLD(xilosa lisina desoxicolato)	36-37°C X 24-48 H	colonias rojas con o sin centros negros	IMVIC	Bacilos gram negativos	7.4 ±0.2
BAM	AGAR CASEINA SOJA	35-37°CX 48-72 H	forma esférica, cilíndrica o elíptica. coloración crema	--	--	7.3± 0.2
HONGO Y LEVADURAS	agar sabouraud dextrosa	22 - 25°C X 7 DIAS	las levaduras forman colonias húmedas, cremosas, opacas o pastosas, y los hongos producen colonias algodonosas, lanosas .	--	--	5.6 ±0.2



7.6 Flujograma de proceso





8 Resultados y Análisis de los resultados

Resultados

Tabla No.3. Resultados determinación de BAM. (Bacterias aerobias mesófilas)

8.1

N.º de Muestra	Resultados a las 72 horas .37°C. UFC/ml	Especificaciones según RTCA 11.03.56.09
1	268 UFC/ml	$\leq 10^4$
2	90 UFC/ml	$\leq 10^4$
3	90 UFC/ml	$\leq 10^4$
4	109 UFC/ml	$\leq 10^4$
5	2 UFC/ml	$\leq 10^4$
6	0 UFC/ml	$\leq 10^4$
7	15 UFC/ml	$\leq 10^4$



Posterior a la incubación de la muestra en placas se procede a evaluar el conteo de colonias viables, en contador de colonias posterior a 72 horas de incubación, se evidencio un crecimiento proliferado en la mayoría de las muestras. las muestras 1,2,3,4,5 y 7 no cumplen con lo establecido y requerido según la RTCA 11.03.56.09 de productos naturales que delimita a no más de 100 UFC/ ml, la muestra 6 cumplen con dichos esta de calidad según la RTCA 11.03.56.09

Resultados determinación de Hongos y Levaduras.

Tabla No.4. Resultados de Hongos y Levaduras.

N.º de Muestra	Lectura de Resultados de RCHYL a las 7 Días de incubación a temperatura 22°C a 26°C	Especificaciones de RTCA 11.03.56.09.
1	216 UFC/ml	$\leq 10^2$
2	148 UFC/ml	$\leq 10^2$
3	42 UFC/ml	$\leq 10^2$
4	>300 UFC/ml	$\leq 10^2$
5	3 UFC/ml	$\leq 10^2$
6	0 UFC/ml	$\leq 10^2$
7	12 UFC/ml	$\leq 10^2$

Posterior a la incubación de la muestra en placas se procede a evaluar el conteo de colonias viables, en contador de colonias posterior a 5 días, evidenciando crecimiento 1,2,3,4,5 y 7 siendo estas las muestras que sobrepasan los límites de aceptación no más de 10 UFC/ ml, la muestra 6 cumplen con lo establecido en el RTCA 11.03.56.09.



Determinación de patógenos

Tabla No.5. Resultados de microorganismo patógenos

N.º de muestra	Staphylococcus áureos	Escherichia coli	Pseudomonas aeruginosa	Salmonella sp.	Especificaciones según RTCA11.03.56.09.
1	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
2	Ausencia	Presencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
3	Ausencia	Presencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
4	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
5	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
6	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
7	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Para la identificación de bacterias patógenas se tomaron en cuenta, las características de crecimientos en cuanto a su forma, superficie, borde, color, aspecto, elevación y posible cambio en el medio de cultivo en cada una de las bacterias en estudio.

Staphylococcus aureus: la evidencia de esta prueba en nuestra muestra 2 y 3 se evidenció de la siguiente manera, puntos redondos de bordes lizos convexos húmedos brillantes negros sin halo, determinando negativo para microorganismo patógeno siendo esta un *staphylococcus setimide*.

Escherichia coli: en las muestras m2 y m3 se aprecia el viraje del color del medio y la presencia de las colonias para *Escherichia coli* siendo estos sus aspecto medio color rosa o rojo intenso rodeada de una zona de precipitación en agar McConkey.

Pseudomonas aeruginosa y *Salmonella*: al analizar estos 2 medios de cultivo no se presenciaron en ninguna de las muestras siendo estas ausentes en nuestras muestras de estudio.



9 Conclusión:

Los productos contemplados para esta investigación, basados en resultados obtenidos después de la realización del límite microbiano, el cual es un ensayo para la determinación de microorganismos en productos fitofarmacéutico, presentaron una carga microbiana trascendente, por lo que podemos concluir que:

Las muestras N° 1,2,3,4,5,7 no son aptas para su comercialización y uso en base a evidencia de no conformes a especificaciones del RTCA 11.03.56:09, para el contenido de bacterias aerobias mesófilas y recuento combinado de hongos y levaduras ; para el caso de las muestras N° 2, 3 no son aptas para su comercialización y uso en base a evidencia que confirma positivo para *Escherichia coli* conformes a especificaciones del RTCA11.03.56:09 que indica ausencia de patógenos ; finalmente la muestra N° 6 demuestra en apego al cumplimiento del RTCA 11.03.56:09, ser la única muestra sanitariamente apta para su consumo en cuanto al recuento de Bacterias aerobias mesófilas y recuento combinado de hongos y levaduras debido a que las cantidades encontradas en el ensayo, son permitidas, por lo tanto, no comprometen la salud de la población. Cabe mencionar que este fitofármaco anteriormente mencionado, no posee bacterias patógenas que puedan producir una enfermedad adicional a la persona al consumir el producto.



10 Recomendaciones:

- A los laboratorios involucrados en la fabricación de productos naturales que realicen un mejor control con respecto a las buenas prácticas de manufactura a lo largo de todo el proceso de elaboración de los productos, así como del personal que participa en este.
- Al laboratorio involucrados en la fabricación de productos naturales trabajar con materias primas que posean un registro sanitario para garantizar la calidad del producto y de esta manera reduciendo un índice de contaminación para la muestra.
- Al MINSA el cual debe realizar una revisión estricta y continua desde el punto de vista microbiológico a cerca del cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufacturas (BPM) a lo largo de todo el proceso de elaboración de los productos naturales, así como del personal que participa en este.



11 Bibliografía

1. Acosta de la Luz, L. A. (2002), Desinfección de Plantas Medicinales- Principios básicos. Cuba. Aguilera Gallardo, S.E. (2012). Validación de seis Fitofarmacos: Ajenjo, Nogal, Pasionaria, Salvia, Sábila y Jengibre en pacientes adultos de diecinueve a setenta años de edad en Quito, junio – agosto de 2010. Revisado: junio 2019. Disponible: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/5252/T-PUCE-5478.pdf>
2. Andrade, A. Valdiviezo, A. (2012). Control microbiológico de cosméticos elaborados artesanalmente en base de productos naturales en la ciudad de Quito. [Tesis de grado]. Quito: Pontificia Universidad Católica de Ecuador. Escuela de Bioanálisis. Revisado: Julio 2019. Disponible: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/9579/merged%20%2848%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
3. Anderson, L. Barnes, J., Phillipson, D. (2005). “Guía para los profesionales de la Salud”. Plantas Medicinales. Primera edición. Pharma editores. Barcelona.
4. Bustos, J.; Hamdan, A. y Gutiérrez, M. 2006. Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Revista Biomédica, núm. 4, 17:287-305. Revisado: junio 2019. Disponible: <http://revistabiomedica.mx/index.php/revbiomed/article/view/467>
5. Cáceres, A. (2010). “Control de calidad microbiológica de plantas medicinales y productos fitofarmacéuticos”. [En Línea]. Disponible en: http://www.fbioyf.unr.edu.ar/rrii/varios/pdf2010sharapin/sharapin2010_cacerescontrolcalidad.pdf . [Consultado octubre,2023)



6. Cáceres Cartagena, M.P. (2018). Determinación de la calidad microbiológica de cosméticos capilares elaborados a base de compuestos naturales comercializados en Lima Metropolitana. [Tesis de grado]. Lima, Perú. Universidad Ricardo Palma. Revisado: mayo 2019. Disponible: http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/URP/1750/Caceres_mp.pdf?sequence=1&isAllowed=y
7. Gudiño, R. 2013. Control microbiológico de cremas faciales, a base de productos naturales, comercializadas en centros naturistas de la ciudad de Quito. [Tesis de grado]. Quito: Universidad Central de Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas. Revisado: mayo 2019. Disponible: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/1125>
8. Herrera, Gloria María, tutora Bustos Matamoros, Shirley Valeska Gómez Parrales, Jordin Josué Gutiérrez León, Javier Humberto (2019). Calidad microbiológica de jarabes a base productos naturales, comercializados en centros naturistas del mercado La Terminal de la Ciudad de León, Nicaragua. Febrero - noviembre 2019. <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/handle/123456789/8128>.
9. Forysthe, Sthepen, J. (2002). "Higiene de los alimentos, Microbiología y HACCP". 2da. Ed. Editorial Acribia. S.A. [En Línea]. Disponible en: <http://www.casadellibro.com/libro-higienede-los-alimentos-microbiologia-y-haccp2ed/9788420009865/839826> . [Consultado noviembre, 2023].
10. Pascual, M. (2000). "Microbiología Alimentaria: metodología analítica y bebida". 2 ediciones. Madrid. Ed. Díaz de Santos. S.A.
11. Yaleria Patricia Roa Martínez Jaime Alexander Saborío Carvajal (2018). Evaluación de la Calidad Microbiológica Utilizando el método de límite microbiano de limpia colon a base de productos naturales más comercializados en la ciudad de León. <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/6836/1/240500.pdf> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26106278/>



12. Torres M. (2006). "Análisis microbiológico de materias primas utilizadas en la elaboración de productos naturales en una industria colombiana". [En Línea].

Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis251.pdf> .
[Consultado OCTUBRE, 2023].

13. Vélez, M., Cuadro, B. 2005. Control microbiológico a medicamentos, cosméticos y desinfectantes. Editorial Universitaria: Cartagena, 1 ed.

14. Vila Jato, J. (2008). Tecnología farmacéutica. Madrid: Síntesis, D.L

15. Vogel Hermine. (2003). Programa de Promoción de la Innovación de FIA. Como producir y procesar plantas medicinales y aromáticas de calidad. Boletín Trimestral ISSN 0718-0357 N° 8. Chile. 2003. Revisado: mayo 2019. Disponible en: <http://bibliotecadigital.fia.cl/handle/20.500.11944/1900>

16. Hernández Sampieri, Roberto; et al. Metodología de la Investigación. 2a. ed. McGraw-Hill. México, D.F., 2001. Pág. 52 - 134.

17. <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/5252/T-PUCE-5478.pdf?sequence=1&isAllowed=y>



12 Anexo Desarrollo



Fig ¿??



Resultado prueba de BAM y microorganismos patógenos

