



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
ESCUELA DE FARMACIA
UNAN-LEON**



**INFLUENCIA DEL DILUYENTE EN LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS
EN MEDICAMENTOS DE USO TÓPICOS.**

**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIADOS
QUIMICOS FARMACEUTICOS.**

AUTORES:

Br. Hermes Salvador Balmaceda Jarquin

Br .Joel de la Trinidad Canales Zamora

Br .Ligia Amanda Cardoza Corea

Tutor: Lic. Kelvin Núñez

León Nicaragua Mayo 2005



Ligia Amanda Cardoza Corea

DEDICATORIA.

El producto de los esfuerzos y trabajos realizados durante cinco años en esta “Alma Mater” llegan a su culminación, brotando el fruto deseado y esperado, durante mucho tiempo.

Con el mismo amor con que fue realizado este trabajo, lo dedico a las personas que mi corazón guarda para ellos un latido y una fibra.

A Dios Padre Todopoderoso: Farmaceuta Supremo, le doy gracias por la vida, capacidad y fuerza necesaria para condición exitosa de este trabajo. Por guiarme en el difícil camino a seguir durante mi carrera profesional.

A mis Padres: Javier Cardoza y Marlene Corea por su comprensión en mis horas de ausencias y estar pendiente de todas mis necesidades y apoyarme en todas mis decisiones.

A mis Hermanas: Margie Elizabeth y Marlen con un especial cariño siempre estuvieron en todo momento y me brindaron su apoyo incondicional.

A Margie Valentina y Gonzalo Javier: rayitos de luz que han alegrado mi vida universitaria, todo mi amor y cariño para ellos.

A mis Abuelitos que partieron a la vida eterna dejando huellas en mi corazón de su cariño y sus consejos.

A mi Abuelita: Carmen por todos sus consejos, atenciones, cariño y buenos deseos de mi superación.

AGRADECIMIENTO

A mi tutor Lic Kelvin Núñez por brindar gran parte de su tiempo y apoyo incondicional en el proceso de esta investigación así como su eficiente labor y guía.

Al Personal Docente y Administrativo por su sus labores y tolerancia al poner a nuestro servicio sus conocimientos.

A mis compañeros por sus horas compartidas sus nombres irán escritos en mi mente con la tinta indeleble del recuerdo.



Hermes Salvador Balmaceda Jarquìn:

Dedicatoria:

Dedico este trabajo a mi madre y hermana, las quiero mucho.

A mi mejor amigo Roberto y su familia.

A mi abuelo Salvador Balmaceda le digo: al fin lo logré; espero estés orgulloso, te extraño mucho, que Dios en paz te tenga.

Agradecimiento:

Agradèzcole a Dios, por ser mi fuerza de vida e impulso que motiva mis acciones. A mi madre Ana María Jarquìn y mi hermana Ana María Balmaceda, por su ayuda incondicional y amor imperecedero a través de la distancia. A mi abuela María Félix Iglesias, por aguantarme todos los días. Al Lic. Kelvin Núñez, por ayudarnos en la elaboración de este trabajo.



Joel de la Trinidad Canales Zamora:

Dedicatoria

A Dios que me dio fuerza para salir adelante y ser siempre mi guía

A mis padres Mercedes Zamora y Emilio Canales que me dieron su apoyo y nunca dudaron de mi.

A mi esposa e hija que siempre estuvieron apoyándome y fueron mi mayor inspiración para salir adelante.

A mi abuelita Petrona Ramos por estar siempre muy pendiente de mi.

A mis hermanitos Roque Enoc, Emilio Mercedes y Cristine Elisa Canales Zamora.

Agradecimiento

A Dios por guiarme e iluminarme en todo momento.

A toda mi Familia que siempre creyeron en mi y no dudaron en brindarme su apoyo incondicional.

A mi Tutor Lic Kelvin Núñez por todo su apoyo durante la realización de este trabajo.



INDICE

	Pág.
Introducción.....	3
Objetivos.....	6
Marco Teórico.....	8
Material y Método.....	27
Resultados.....	33
Análisis de Resultados.....	37
Conclusiones.....	39
Recomendaciones.....	41
Bibliografía.....	42
Anexos.....	45



INTRODUCCION



INTRODUCCION

En la década de los cincuenta, se recomendaba la siembra directa de la muestra sin diluir en el medio de cultivo pero no se obtenían resultados satisfactorios ya que la mayor parte de los microorganismos no alcanzaban el medio nutritivo por la escasa superficie de contacto y por quedar englobados en una capa de grasa si el preparado era lipófilo.

En el presente estudio se evaluó la efectividad de un diluyente a diferentes concentraciones de tween 20 y tween 80 que son utilizados en análisis microbiológico de productos farmacéuticos tópicos, siendo que los productos tópicos incorporan como excipientes bases de origen oleaginosas alcoholes grasos, vaselina, ceras, fases de tipo o/w (aceite en agua) y w/o (agua en aceites) Es posible que dichos excipientes puedan afectar la recuperación de microorganismos que estuviesen presentes en dichas muestras (para el caso de muestras contaminadas), no debe obviarse que debe tomarse siempre encuentra la formulación ya sea de origen hidrófilo o lipófilo

En el presente estudio se utilizaron agentes tensioactivos tween 20 y 80 en concentraciones de 1, 4 y 10%; de los cuales los resultados muestran la efectividad del tween 20 al 10% para los 3 productos analizados con 3 microorganismos indicadores diferentes , tanto para el recuento en placa como para la serie de evaluación de NMP (números mas probables), de los cuales para el caso de muestras que contengan organismos fermentadores la serie de NMP evidencia una mejor recuperación de microorganismos

Esperamos que el presente estudio sea un aporte para quienes laboran en áreas de control microbiológico de medicamentos, puesto que las Farmacopeas internacionales únicamente establecen que para el análisis de muestras de este tipo (uso tópico: ungüento, pomadas, cremas, geles, preparados o/w y o/w) se utilicen agentes tensioactivos en rango del 1% al 10 %; estamos seguros que nuestro trabajo será por ello una importante referencia.



En el presente estudio se evalúa la influencia de algunos diluyentes en la detección de la contaminación microbiana únicamente de medicamentos hidrófilos de administración tópica. Los diluyentes empleados han sido: triptona sal con diferentes concentraciones de polisorbato 20 y 80.



OBJETIVOS



Objetivo General

- Evaluar el efecto de un diluyente a diferentes concentraciones en el análisis microbiológico de medicamentos de uso tópico.

Objetivo Especifico

- Evidenciar mediante ensayos si existe diferencia significativa en la recuperación de microorganismos al utilizar un diluyente a diferentes concentraciones.
- Destacar la importancia que amerita la selección del diluyente en la recuperación de microorganismos.
- Comparar técnicas de recuento de microorganismos para su detección y recuperación (NMP, recuento en placa) .



MARCO TEORICO



MARCO TEÓRICO

Influencia Del Diluyente En La Detección De Microorganismos En Medicamentos Tópicos.

Los polisorbatos, agentes tensioactivos, tween o span han sido tradicionalmente utilizado en el análisis de productos de base oleosa o de aspecto untuoso, tales como pomadas, ungüentos, cremas, lociones. (1)

Polisorbatos (1)

Uno de los componentes de un grupo agentes tensioactivos no ionicos que se obtienen por esterificación del sorbitol con una o tres moléculas de un ácido graso (esteárico, láurico, palmitico, oleico) en condiciones que causan la eliminación de agua del sorbitol, quedando sorbitano.

- **Propiedades:** líquido aceitoso de color limón o ámbar; P.e. aprox. 1.1; olor débil y sabor amargo; la mayoría son soluble en alcohol, agua y acetato de etilo; combustible; no tóxico. Aprobado su uso en comestibles.
- **Usos:** agente tensioactivo, emulsionante, dispersante, manteca para mezclar con la masa, pastelería y artículos cocidos, productos farmacéuticos.(7)

La presencia de sustancias antimicrobianas puede dificultar la recuperación de los microorganismos que se encuentren presentes a su vez dificulta la homogenización de estos productos que suelen llevar componentes hidrófobos con los medios de cultivo acuosos.

Aunque algunos preparados líquidos pueden examinarse de forma directa. La mayoría de los productos deben homogenizarse previamente en un líquido adecuado, el cual depende de la naturaleza del medicamento (hidrófilo o



hidrófobo), del método de recuento que se vaya a utilizar y de la presencia del poder inhibitorio intrínseco.

Los productos grasos, inmiscibles con el agua y soluciones acuosas de agentes tensoactivos, se homogenizan en disolventes oleosos, siendo unánime el empleo de miristato de isopropilo como diluyente para las muestras oleosas.

Por otra parte, las muestras hidrófilas, insolubles en miristato de isopropilo, pueden dispersarse en soluciones acuosas, de las que el agua de peptona es la más aconsejable, ya que ayuda a la revivificación de los microorganismos lesionados. Cuando el preparado tiene componentes insolubles en agua hay que añadir agentes tensoactivos para formar un homogenizado estable.

No existe unanimidad entre los diferentes autores consultados sobre qué diluyente es el más adecuado para estos medicamentos tópicos hidrófilos, por lo que en este trabajo se ha realizado el estudio comparativo de varios diluyentes para determinar su influencia sobre la detección de la contaminación bacteriana y fúngica de este tipo de medicamentos, así como sobre la recuperación de microorganismos patógenos inoculados en las mismas muestras.

Pomadas: Definición Y Características Generales

Las pomadas constituyen un grupo de preparados farmacéuticos muy heterogéneos, caracterizados por su consistencia semisólida. Están destinadas a ser aplicadas sobre la piel o sobre ciertas mucosas con el fin de ejercer una acción local o de dar lugar a la penetración cutánea de los medicamentos que contienen. Constan de un excipiente sencillo o complejo, en cuyo seno se disuelven o se dispersan los principios activos.

Todos los preparados de consistencia semisólida están, de hecho, englobados en la definición genérica de pomadas, pero a menudo se utilizan otras definiciones



màs específicas, relacionadas con sus características físico químicas y su consistencia man o menos blanda. Así en la Farmacopea Europea se distinguen varias categorías de pomadas:

Pomadas propiamente dichas: constan de un excipiente de una sola fase en el que se pueden dispersar solidos o liquidos

- **Hidròfobas (lipòfilas).** No pueden absorber màs que pequeñas cantidades de agua. La sustancia que se emplean con màs frecuencia en su formulaciòn son la vaselina, la parafina, la parafina liquida, los aceites vegetales, las grasas animales, los glicèridos sintèticos, las ceras y los polialquilsiloxanos liquidos.
- **Absorbentes de agua.** Pueden absorber grandes cantidades de este liquido. Sus excipientes son los de las pomadas hidròfobas a los cuales se incorporan emulgentes de tipo w/o, como la lanolina, los alcoholes de grasa de lana, los èsteres del sorbitano, los monoglicèridos y los alcoholes grasos
- **Hidròfila.** Se elaboran con excipientes miscibles en agua, tales como los polietilenglicoles liquidos y solidos (macrogoles). Pueden contener cantidades adecuadas de agua

Crema. Son pomadas multifasicas constituidas por 2 fases una lipòfila y otra acuosa

- **Hidròfobas.** La fase continua o externa es la fase lipòfila debido a la presencia en su composición de emulgentes tipo w/o.
- **Hidròfilas.** La fase externa es de naturaleza acuosa debido a la presencia en su composición de emulgentes de tipo o/w, tales como jabones sòdicos o de trietanolamina, alcoholes grasos sulfatados y polisorbados, a veces combinados en porciones convenientes con emulgentes tipo w/o.

Geles. Estas preparaciones estan formadas por liquidos gelificados con ayuda de agentes apropiados.



- **Hidrófobos (oleogeles).** Están constituidos por excipientes como la parafina líquida adicionada de polietileno, aceites grasos gelificados con sílice coloidal o por jabones de aluminio o zinc.
- **Hidrófilos (hidrogeles).** Se elaboran con excipientes hidrófilos como el agua, el glicerol y los propilenglicoles, gelificados con sustancias como goma de tragacanto, almidón, derivados de la celulosa, polímeros carboxivinílicos, silicatos de magnesio y aluminio

Pastas. Contienen elevadas proporciones sólidos finamente dispersos en el excipiente por lo que, generalmente, su consistencia es bastante elevada. (1)

Genero Staphylococcus.(2)

Los ***Staphylococcus*** son células esféricas gram positivas de cerca de 1µm de diámetro. Suelen estar distribuidas en cúmulos irregulares a manera de racimos de uvas. En cultivos líquidos se encuentran también cocos aislados, en pares, en tetras y en cadenas.

Los cocos jóvenes se tiñen intensamente con la coloración de gram, al envejecer se vuelven gram negativos. Los estafilococos son microorganismos no móviles y no forman esporas. Bajo la influencia de ciertas sustancias químicas (por ejemplo, penicilina) experimentan lisis o cambian a forma L, pero no los afectan las sales biliares ni la optoquina.

Staphylococcus aureus: (3)

Estos cocos, clásicamente: fermentan el manitol y la lactosa, son proteolíticos, producen coagulasa, producen pigmento dorado, producen lipasa, forman amplias zonas de hemólisis aeróbica en las placas de agar sangre, crecen en medios que contengan un 10% de cloruro de sodio. (5)



Los estafilococos crecen con facilidad en la mayor parte de los medios bacteriológicos bajo condiciones aerobias o microaerófilas. Crecen con mayor rapidez a 37°C, pero forman mejor el pigmento a temperatura ambiental (20 a 25°C).

Los *Staphylococcus aureus* forman colonias de color gris a amarillo dorado intenso. La mayor parte de las cepas de *Staphylococcus aureus* tienen coagulosa, o factor aglutinante, sobre la superficie de la pared celular. La coagulosa se fija de manera enzimática con el fibrinógeno, y de esta manera produce agregación bacteriana. .(8)

Patología.

Los grupos de *Staphylococcus aureus* establecidos en un folículo piloso, produce necrosis tisular (factor dermonecrótico) (3). En caso de osteomielitis el foco primario de crecimiento de *Staphylococcus aureus* es, de manera típica, un vaso sanguíneo terminal de la metafisis del hueso largo, que produce necrosis ósea y supuración crónica. Los *Staphylococcus aureus* puede producir también neumonía, meningitis, empiema, endocarditis y sepsis con supuración en cualquier órgano.

Los estafilococos producen también enfermedad mediante elaboración de toxinas. La exfoliación bulosa, o síndrome de piel escaldada, se debe a producción de toxina exfoliativa.

Genero Shigellas.

Este género se compone de bacilos no móviles y no encapsulados que fermentan la glucosa y otros hidratos de carbono con producción de ácido, pero no de gas (excepto ciertas especies). Los microorganismos son incapaces de utilizar el citrato como única fuente de carbono, el crecimiento es inhibido por el sulfuro de



bismuto, no se producen ureasas, ni H₂S (sulfuro de hidrogeno). El KCN (cianuro de potasio) también inhibe su crecimiento.

Las *Shigellas* son bastoncillos gramnegativos delgados, en los cultivos recientes se producen formas cocobacilares. Son microorganismos anaerobios facultativos, pero crecen mejor en medios aerobios. Las colonias de forma convexa, circulares y transparentes alcanzan un diámetro cerca de 2mm en 24 hrs. El hábitat natural de las *Shigellas* está limitado a las vías intestinales del hombre y otros primates, en los cuales producen disentería bacilar. (3)

Shigella dysenteriae.

Las *Shigellas* causan trastornos intestinales que se traducen en diarreas desde muy ligeras hasta graves, a veces en una disentería fatal, con inflamación intensa y ulceraciones del intestino grueso, a menudo con formación de cicatrices y estenosis del intestino después de la recuperación. Al contrario de *Salmonella typhi*, que causa siempre una bacteriemia. *Shigella* no suele invadir la sangre.

Shigella dysenteriae del tipo 1 (bacilo de shigas) produce una exotoxina termolábil que afecta tanto al intestino como al sistema nervioso central.

La exotoxina es una proteína antigénica (que estimula la producción de antitoxinas) mortal para los animales de experimentación. Al actuar como enterotoxina produce diarrea como la enterotoxina termolábil de *E.coli* quizás por el mismo mecanismo

En el hombre, la exotoxina inhibe también la absorción de azúcares y aminoácidos en el intestino delgado. Al actuar como “neurotoxina” puede contribuir a la gravedad extrema y la naturaleza mortal de las infecciones por *Shigella dysenteriae*, y a las reacciones del sistema nervioso central (meningioma, y coma).



Bacterias Generalidades Clasificación De Los Microorganismos (2)

Una clasificación hasta hace poco utilizada es la de Robert Whittaker (1969), quien clasifica a los organismos en los siguientes 5 reinos:

1. Procariotae (Monera)
2. Protista
3. Fungi
4. Plantae
5. Animalia

Bacterias Gram Positivas

La mayoría de las bacterias Gram(+) poseen una pared celular compuesta por varias capas de peptido-glucano, así las paredes de las Gram(+) son más gruesas que las Gram(-). Muchas bacterias Gram(+) poseen en su pared Acidos Teicoicos (sirven para identificar por inmunodiagnos).

Acidos Teicoicos:

Están formados por un alcohol (glicerol o ribitol) y fosfato, y están unidos a las capas de peptido-glucano o membrana citoplasmática. Los ácidos teicoicos, debido a su carga negativa (de los grupos fosfatos) pueden controlar la entrada y salida de cationes. También juegan un papel en la actividad de crecimiento y están implicados en el almacenaje del fósforo. (5)

Bacterias Gram Negativas

Poseen peptido-glucano pero en una proporción muy pequeña. No poseen ácidos teicoicos y el peptido-glucano se encuentra en el espacio periplasmático (espacio entre la membrana citoplasmática y membrana externa). Al tener menor cantidad de peptido-glucano, las paredes celulares de las bacterias Gram(-) son más sensibles a la ruptura mecánica. La capa de peptido-glucano de las bacterias Gram(-) está rodeada de una membrana externa compuesta de: lipoproteínas, lipopolisacáridos y fosfolípidos.



Paredes Celulares Atípicas

1. MOLLICUTES. Por no poseer pared celular, pueden pasar a través de los filtros bacterianos. Sus membranas citoplasmáticas pueden poseer esteroides (se piensa que los protegen de la lisis de presión osmótica). En micoplasmas la célula está rodeada de paredes de fosfolípidos (glicolípidos y lípidos neutros). En espiroplasmas la membrana está constituida por espiralina (PM 26.000).
2. ARQUEOBACTERIAS. Poseen paredes celulares compuestas por azúcares y proteínas, pero no por peptido-glucano.
3. FORMAS L. Son bacterias mutantes defectivas en su pared (algunos antibióticos como la penicilina induce la formación de cepas de bacterias que poseen esta característica).

Membrana Externa De La Pared Celular De Las Bacterias Gram Negativas

La Membrana Externa de la Pared Celular de las bacterias Gram Negativas está compuesta por: lipoproteínas, lipopolisacáridos y fosfolípidos. (3)

Funciones:

1. Proveer canales de difusión pasiva de nutrientes o solutos hidrofílicos.
2. Establecer una barrera a antibióticos (ej. penicilina), detergentes, metales pesados, enzimas digestivas, colorantes u otros tóxicos.
3. Barrera contra enzimas como Lisozima (puede romper pared celular de Gram(+)) y de pocas Gram(-)).
4. Alta carga negativa le permite evadirse de fagocitosis.
5. Facilitar y mantener acoplamiento en Conjugación.
6. Proveer sitios receptores a bacteriocinas y bacteriófagos.
7. Otorgar hidrofiliidad a la superficie celular.



Componente Lipopolisacárido (Lps) De La Pared Celular De Las Bacterias Gram(-)

Funciones:

- Polisacáridos O: antígenos que ayudan a distinguir especies de Gram(-) por serología (ej. *Salmonella*).
- Lípido A: se conocen como Endotoxinas, por ser tóxico cuando se libera a la sangre (fiebre y shock).

Membrana Citoplasmática

La membrana citoplasmática, generalmente es de 8 nm de grosor y es la barrera vital que separa el interior de la célula (citoplasma) de su medio ambiente. Se localiza al interior de la pared celular. Es barrera altamente selectiva (selectivamente permeable) incapaz de concentrar metabolitos específicos y permite excretar desechos fuera de su citoplasma. A través de la membrana citoplasmática pasan todos los nutrientes a la célula y todos los desechos que elimina. Está formada mayoritariamente por fosfolípidos (30-40%) y proteínas (60-70%) (al no poseer esteroides es menos rígida que en eucariotas).

Funciones:

- Selectivamente Permeable (semipermeable). Las proteínas no pueden pasar, pero sí el agua, aminoácidos y algunos azúcares. Los iones penetran lentamente, las sustancias que se disuelven fácilmente en lípidos entran y salen con facilidad (O₂, CO₂, moléculas orgánicas apolares).
- Contiene Enzimas (para el metabolismo energético: citocromos, citocromoxidasa, deshidrogenasas, ATPasas, proteínas sintetetasas, permeasas). Pigmentos y enzimas implicados con fotosíntesis se localizan en invaginaciones de la Membrana Citoplasmática que se extienden por todo el citoplasma, éstas se llaman Cromatóforos Tilacoides.



HONGOS Y LEVADURA GENERALIDADES

Mucha gente tiende a confundir **hongo** y **seta**. De hecho el término **hongo** puede resultar un tanto equívoco en lenguaje coloquial. Para algunos, los hongos son algún tipo de seta, comestible o no. No obstante, desde el punto de vista científico las diferencias son claras: los **hongos** son unos organismos peculiares, fascinantes y muy diversos; las **setas** son las fructificaciones o cuerpos fructíferos de ciertos hongos.

Por tanto, antes de continuar, se hace necesario definir el término **hongo**. Básicamente, se aplica a todo aquel organismo estudiado por los **micólogos**. Y ¿qué es un micólogo? Pues alguien dedicado al estudio de los hongos.

Organismos que parecen hongos, pero que no lo son realmente. Tratemos de precisar más la definición. Los hongos constituyen un grupo ciertamente heterogéneo, que incluye a seres no emparentados entre sí. Los hongos, en sentido amplio, presentan estas características:

- **Son eucariotas.** Al igual que nosotros mismos, sus células poseen núcleos verdaderos donde están encerrados los cromosomas. En eso se diferencian de los procariotas, como las bacterias, cuyo ADN está disperso en el citoplasma. Además, las células eucariotas suelen ser mayores y más complejas.
- **Normalmente son multinucleados.** Por supuesto, hay especies microscópicas, con un solo núcleo, como las levaduras. Sin embargo, los hongos suelen presentar muchos núcleos en sus cuerpos. En ocasiones, como en el caso de los animales, el cuerpo está dividido en muchas células, cada una con su correspondiente núcleo.



- **Se reproducen por medio de esporas.** Por supuesto, no son los únicos organismos que lo hacen (las algas constituyen otro buen ejemplo). Sin embargo, en los hongos las esporas son tremendamente variadas, móviles o inmóviles, sexuales o asexuales. Muchos hongos producen sus esporas en estructuras microscópicas, mientras que otros forman cuerpos fructíferos para liberarlas. Las setas son las plataformas lanzadoras de esporas de algunos grupos fúngicos.
- **Son heterótrofos, sin clorofila, y se alimentan por absorción.** Al no poseer clorofila, los hongos siguen una estrategia alimentaria muy simple: pudren cosas y absorben los productos resultantes de la descomposición. Algunos hongos, parásitos especializados, presentan estructuras para alimentarse de sus víctimas, cual si se tratase de vampiros. Algunos hongos se alimentan por fagocitosis, como los glóbulos blancos de nuestra sangre.
- El **talo** (soma o cuerpo vegetativo) puede ser unicelular, como en las levaduras o típicamente filamentoso. En este último caso recibe el nombre de **micelio**. De hecho, muchos hongos y mohos tienen aspecto de pelusa. Algunos seres estudiados por los micólogos, como los mixomicetos, forman plasmodios
- El talo está recubierto de una pared de quitina (en los hongos típicos) o de celulosa. En algunos casos, el talo no presenta pared (desnudo).

Los hongos son omnipresentes y cosmopolitas; pueden aparecer prácticamente en cualquier sitio, y alimentarse de lo más insospechado. Se conocen más de 80.000 especies de hongos, aunque probablemente existen muchísimas aún no descritas (tal vez más de un millón).



La mayor parte de los hongos son saprofitos (descomponen la materia muerta), y juegan un papel de vital importancia en el mantenimiento de los ecosistemas, reciclando la materia orgánica que luego podrá ser utilizada por los vegetales. Por otro lado, hay varios miles de especies que parasitan a las plantas; de hecho, los hongos son los fitopatógenos por excelencia. En comparación, sólo unas cincuenta especies provocan enfermedades (**micosis**) en humanos. Otros hongos viven en simbiosis mutualistas, como los **líquenes** (con algas) y las **micorrizas** (con las raíces vegetales, casi siempre imprescindibles para la supervivencia de las plantas en ecosistemas naturales)

A pesar de esta abundancia, se constata que existe una reducción en el número y cantidad de muchas especies fúngicas. Bastantes se habrán extinguido por culpa de la acción humana, e incontables están en peligro, una muestra más del constante deterioro al que la biosfera se ve sometida. La situación es preocupante. Dejando a un lado los aspectos morales o conservacionistas del asunto, y ciñéndonos a lo práctico, ¿cuántas fuentes de antibióticos y otras sustancias potencialmente útiles estamos dejando morir? Nuestro futuro, mal que nos pese, está ligado al de los demás organismos que comparten el planeta Tierra.

Para clasificar a estos organismos nos atendremos a las indicaciones de la IX edición del famoso *Dictionary of the fungi*, publicado por CAB INTERNATIONAL en 2001. De todos modos, en ocasiones seguiremos otros criterios.

- **Reino Protozoa:** Protozoos. Es un reino que incluye a seres tan conocidos como los paramecios o las amebas. Casi todos los integrantes de la antigua div. *Myxomycota* se agrupan aquí. Son organismos que no presentan pared celular y se alimentan por fagocitosis. En otros libros, como Alexopoulos *et al.* (1996), se duda que los distintos grupos de hongos ameboides sean monofiléticos.



- **Reino Chromista:** Incluye a protistas con mitocondrias de crestas tubulares y con células cuyos flagelos presentan una especie de pelillos adosados llamados **mastigonemas**. Aquí se pueden encontrar las algas pardas, las diatomeas... y algunos hongos, que en realidad descienden de algas que han perdido la clorofila, como los mildius, y también algunos hongos que antes se incluían en *Myxomycota*, como los labirintulales. En general, las paredes celulares de estos seres no presentan quitina ni glucanos. Alexopoulos *et al.* (1996) denominan a este reino *Stramenopila*.
- **Reino Fungi:** Son los hongos verdaderos, con paredes celulares de quitina y glucanos. Están más emparentados con los animales que con las plantas. Incluye a **Chytridiomycota** (los quítridos, que antes se metían en Mastigomycotina), **Zygomycota**, **Ascomycota** y **Basidiomycota**.

Los hongos **imperfectos** o **mitospóricos** (asexuales) ya no constituyen un grupo aparte, sino que se conectan con grupos ya existentes.

A modo de resumen:

- Las **especies** relacionadas se agrupan en **géneros**.
- Los géneros se agrupan en **familias**.
- Las familias, en **órdenes**.
- Los órdenes, en **clases**.
- Las clases, en **tipos** o **filos** (los botánicos prefieren usar el término **división**).
- Los filos, en **reinos**.
- Y los reinos, en **dominios**.

Como se ve, hay 8 categorías básicas (**rangos** o **taxones**) a la hora de clasificar. En ocasiones, los científicos usamos otras (superórdenes, subfamilias, subespecies, etc.) cuando se requiere una mayor precisión.



Nomenclatura.

Como se ve, se puede llegar a hilar muy fino a la hora de clasificar. Por supuesto, no todas esas categorías se utilizan; en ocasiones, su empleo indiscriminado es criticado por algunos especialistas.

Algunas categorías adoptan unas terminaciones especiales, que pueden ser distintas según el grupo (los zoólogos usan terminaciones diferentes a los botánicos; los hongos, diferentes a las algas, etc.). Por ejemplo:

- Los nombres de filos de hongos terminan en ***-mycota***.
- Los subfilos, en ***-mycotina***.
- Las clases, en ***-mycetes***.
- Las subclases, en ***-mycetidae***.
- Los órdenes, en ***-ales***.
- Los subórdenes, en ***-ineae***.
- Las familias, en ***-aceae***.
- Las subfamilias, en ***-oideae***.
- Las tribus, en ***-ieae***.
- Las subtribus, en ***-inae***.

Desde tiempos del insigne Linneo, las especies se designan por un nombre científico. Éste consiste en un binomio, formado por dos palabras latinas o latinizadas. La primera es el nombre genérico; se escribe en mayúsculas, y hace referencia al género. La segunda es el nombre específico; se escribe en minúsculas, y se refiere a la especie concreta de que se trata. El binomio (y, en realidad, todos los nombres de taxones) se escribe en cursiva (o subrayado, si el medio de escritura elegido no dispone de cursivas).



¿Qué son los hongos? ¿Cómo se diferencian de las células humanas y de las bacterias?

Cuando se estudian uno expresa que los hongos son eucariotas, que no es una palabra difícil, sino que significa que las células tienen verdaderos núcleos, con membrana, pero que difieren de las células animales o vegetales. Entre las características más importantes podemos mencionar que son multicelulares, que poseen una pared celular gruesa, diferente de la pared celular de las bacterias, y que pueden crecer de diferentes formas. Son ubicuos en el ambiente y se utilizan con diferentes propósitos tanto en la alimentación, en la industria y lo que es asombroso, en la elaboración de muchos antibióticos.

Las especies que producen infecciones se dividen según la forma de crecimiento o por el tipo de infección que provocan. Pueden existir como formas filamentosas ramificadas o hifas, o como levaduras. Se reproducen en forma asexual y pueden formar esporangios que liberan esporas y así se dispersan, o pueden hacerlo por división o produciendo pequeños brotes, que se llama gemación.

Se conocen dos tipos de micosis o infecciones producidas por hongos:

- **Micosis superficiales:** los hongos crecen en la superficie del cuerpo: la piel, el pelo, las uñas y en ciertas mucosas como la faríngea o vaginal.
- **Micosis profundas:** afectan órganos internos como el cerebro, los pulmones, etc.

Hay algunas especies que pueden formar parte de la flora normal. Así podemos encontrar especies de *Candida* en el intestino y aun en la vagina.

Las especies de hongos que producen infecciones se pueden cultivar en medios artificiales y se observan con microscopio común.



Taxonomía de los Hongos

Después de las últimas modificaciones hechas en el Congreso Internacional de Micología de 1994, donde se han introducido muchos cambios, el reino queda:

Reino Fungi:

- ***Phylum Chtridiomycota***
- Phylum Zygomycota
- Phylum Ascomycota
- Phylum Basidiomycota

Factores Que Afectan El Crecimiento De Microorganismos En Los Medios De Cultivo.

Los medios de cultivos utilizados deben contener todos los nutrientes requeridos para el microorganismo a cultivarse y ciertos factores como temperatura, PH optimo de crecimiento, aireación que deben ser controlados cuidadosamente. Los Agares son polisacáridos que se extraen de algas marinas y son particularmente adecuados para el cultivo microbiano, porque resiste la acción microbiana generalmente se disuelven a 100°C, pero no forman gel hasta que se enfría por debajo de 45°C (6)

Para muchos microorganismos un solo compuesto (como un aminoácido) puede servir como fuente de energía, otros requieren compuestos diferentes. Es importante a su vez considerar el PH óptimo para cada especie, generalmente los microorganismos neutrofilos crecen mejor a PH 6-8, algunos acidófilos tienen PH óptimo tan bajo como 3 y otros alcalófilos PH altos como 10.5. (8)

La temperatura es otro aspecto importante que varía ampliamente, las formas psicrófilas crecen, mejor a temperaturas bajas 15-20 °C, las formas mesófilas lo hacen mejor 30-37°C, la mayor parte de las termófilas de 50-60°C. las temperaturas extremas inhiben el crecimiento de microorganismos, por lo que son bien utilizadas para esterilizar las preparaciones, el frío extremo igualmente inhibe el crecimiento de las células bacterianas, aunque su utilización no es segura para la esterilización. (4)



MATERIAL Y METODO



MATERIALES Y MÉTODOS.

Tipo de estudio: el presente estudio es de tipo experimental y descriptivo.

Área de estudio:

Area de control microbiológico del departamento de análisis de Drogas, tóxicos y medicamentos ubicado en el Campus Medico, Facultad de Ciencias Químicas.

Muestras:

Se emplearon 3 muestras correspondientes a especialidades farmacéuticas de uso tópico elegidas dentro de la línea de producción de Laboratorios Mauricio Díaz Muller, y correspondientes a las formas farmacéuticas de pasta y ungüento.

Unidad de análisis:

Diluyente utilizado a diferentes concentraciones en control microbiológico de medicamentos de uso tópico.

Tipo de muestreo:

Por conveniencia.

Criterios de selección:

- Medicamentos de uso tópico.
- Analizados según especificaciones de la USP 26.

Procedimiento para la recolección de las muestras:

Las muestras analizadas fueron proporcionadas por el laboratorio Mauricio Díaz Muller previa coordinación con la dirección del mismo para tal efecto fueron proporcionadas 3 muestras de 10 unidades físicas cada una.



Plan de Análisis:

Los resultados se muestran en tablas comparativas que permitan visualizar los resultados de manera individual así como comparativa de los resultados generales de todas las concentraciones del diluyente.

Procedimiento Analítico:

1. Cultivo de microorganismos para el ensayo :

Con un Asa estéril se transfieren una o dos asadas de microorganismo (***Staphylococcus aureus***), a un tubo inclinado estéril que contenga 10ml de agar-caseína. Este envase se marca y se incuba a 37°C por 24 horas esta operación se realiza sucesivamente al menos de 3 días con el objetivo de lograr la activación del microorganismo.

Repetir este procedimiento para cultivo de microorganismo ***E.coli, Klebsiella pneumoniae***.

2. Preparación de la suspensión de microorganismo :

A las cepas previamente incubadas se procedió a adicionarles un volumen de solución salina al 0.9 % con el objetivo de disolver el microorganismo; posteriormente a esto se hacen diluciones necesarias hasta obtener una valor de 25 % de transmitancia a 580 nm, esto a fin de establecer un numero de ufc estándar para el ensayo previo a la inoculación de las muestras.

3. Toma de muestras y preparación de las diluciones.

Se tomaron 5 unidades físicas de cada especialidad farmacéutica del total de las 10 unidades de un mismo lote elegidas al azar. Para cada diluyente, se tomaron en condiciones estériles de cada envase individual. Una muestra representativa de cada unidad física (esto para obtener un pool) obteniéndose así 10 g con las cuales se prepararon las diluciones suspendiéndolas en 90 ml de diluyente.



La homogenización se realizó por agitación mecánica. De esta se hicieron diluciones sucesivas 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .

4. Adición de las muestras para el análisis:

Posterior al vertido del medio en las placas aproximadamente 18 ml una vez que estas habían solidificado, se procedió a adicionar las muestras en la superficie, se homogenizó y posteriormente se incubaron las placas de manera invertida a fin de evitar que la condensación del medio pudiera contaminar la muestra.

5. Procedimiento del NMP :

Se procedió a adicionar 1 ml de inóculo para cada una de las diluciones correspondientes a 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} por triplicado para cada una de las muestras analizadas en el presente estudio.

6. Métodos de recuento:

Para bacterias se empleó el método de dilución en placa con agar tríptica soja incubándose a 37 °C por 24 horas, y el número más probable (NMP) en series de tres tubos con caldo tríptica soja, incubando a 45°C en baño maría durante 24 horas.

7. Detección de microorganismos patógenos:

Se inocularon 3 tubos con 9 ml de la dilución de cada muestra con 1 ml de suspensiones de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* que contenían $n \times 10^{-3}$ células/ml.

Para detectar *E. coli* se realizó el aislamiento en agar EMB; para *S. aureus*, agar 110, y para *Klebsiella*, agar Levine Las bacterias fueron incubadas a 37°C y se comparó el número de u.f.c. con el obtenido de los tubos controles constituidos por 1 ml de báculo con 9 ml de solución salina estéril.



Material Y Equipo Utilizado Para el Ensayo:

En el desarrollo experimental del presente trabajo monográfico se utilizaron los siguientes equipos y materiales:

1. Cristalería:

Erlenmeyer, vidrio reloj, probeta, pipetas, tubos de ensayo, platos petri estándar, beaker, termómetro.

2. Equipos:

Balanza analítica (Sartorius Modelo A-210P), cocina eléctrica (Corning Hot Plate Modelo PC-100), horno (Precision Cientific), agitador (Vortex Genie Modelo H-550-G) ,soportes, aros, mallas, autoclave (Omni-Clave Modelo OCM-A3), autoclave (Electric-Steroclave Modelo 25X), mecheros, incubadora (Precision Scientific Modelo 6M), pHmetro (Corning Modelo 10), equipo de baño maría (Presicion Scintific Modelo 270), horno (Presicion Scintific 368-A), balanza de brazo (OHAUS), espectrofotómetro (Espectronic 580 Modelo 20), pana de baño maría, gradillas metálicas, espátula y asas.

3. Material complementario (descartable):

Bolsa plásticas, frascos color ámbar, papel filtro, papel de aluminio, guantes, nasobuco, gorro, aplicadores, algodón.

4. Reactivos:

- Solución salina de cloruro de sodio 0.9%
- Agar Baird Parker
- Agar Cetrimide
- Agar XLD
- Agar 110
- Agar EMB
- Twen 20
- Twen 80
- Agar TSA
- Agar Saburaud



5. Cepas:

- ***Staphylococcus aureus*** ATCC
- ***Klebsiella pneumoniae*** ATCC
- ***E.coli*** ATCC

6. Diluyentes.

- Triptona sal con 1% ,4%, y 10% de polisorbato 20.
- Triptona sal con 1 %y ,4%, y 10% de polisorbato80.



RESULTADOS



RESULTADOS

TABLA 1 MUESTRA 1 MICROORGANISMO 1

Diluyente	Método	Numero de Bacterias por g							
		< 10		10-100		100-1000		>1000	
		N ⁰	%	N ⁰	%	N ⁰	%	N ⁰	%
Tripona Sal 1% tween 20	Placa	2	66	1	4	0	0	0	0
	NMP	3	79	1	33	3	12	1	4
Tripona Sal 4% tween 20	Placa	2	54	1	12	1	4	0	0
	NMP	3	79	1	41	1	30	1	4
Tripona Sal 10% tween 20	Placa	3	70	3	16	1	6	0	0
	NMP	3	75	3	37	3	32	1	6
Tripona Sal 1% tween 80	Placa	1	54	1	20	1	2	0	0
	NMP	1	62	2	41	2	21	0	0
Tripona Sal 4% tween 80	Placa	1	37	2	20	1	6	0	0
	NMP	1	54	2	54	1	25	2	3
Tripona Sal 10% tween 80	Placa	1	58	1	4	0	0	0	0
	NMP	1	58	2	52	2	22	2	3

TABLA 2 RECUPERACION DE *Staphylococcus aureus* UTILIZANDO DIFERENTES DILUYENTES

Muestra	Control ufc x10 ³	Diluyentes					
		T ₂₀ 1%	T ₂₀ 4%	T ₂₀ 10%	T ₈₀ 1%	T ₈₀ 4%	T ₈₀ 10%
		1	3.6 ^a	2.7 ^a /75 ^b	3.0/83 ^b	2.7/75 ^b	0.9 ^a /25 ^b
2	3.6 ^a	1.3 ^a /36 ^b	2.8 ^a /77 ^b	3.3 ^a /91 ^b	1.3 ^a /36 ^b	1.2 ^a /33 ^b	1.7 ^a /47 ^b
3	3.6 ^a	2.0 ^a /46 ^b	2.7 ^a /75 ^b	2.3 ^a /63 ^b	2.0 ^a /55 ^b	2.0 ^a /55 ^b	2.2 ^a /61 ^b

TABLA 3 RECUPERACION DE *Escherischia coli* UTILIZANDO DIFERENTES DILUYENTES

Muestra	Control ufc x10 ³	Diluyentes					
		T ₂₀ 1%	T ₂₀ 4%	T ₂₀ 10%	T ₈₀ 1%	T ₈₀ 4%	T ₈₀ 10%
		1	3.6 ^a	2.1 ^a /58 ^b	2.6 ^a /72 ^b	2.7/75 ^b	1.2 ^a /33 ^b
2	3.6 ^a	1.3 ^a /36 ^b	3.2 ^a /88 ^b	3.4 ^a /94 _b	1.3 ^a /36 ^b	1.2 ^a /33 ^b	1.7 ^a /47 ^b
3	3.6 ^a	1.3 ^a /32 ^b	3.0 ^a /83 _b	2.3 ^a /63 ^b	2.0 ^a /55 ^b	2.0 ^a /55 ^b	2.2 ^a /61 ^b



TABLA 4 RECUPERACION DE *Klebsiella pneumoniae* UTILIZANDO DIFERENTES DILUYENTES

Muestra	Control ufc x10 ³	Diluyentes					
		T ₂₀ 1%	T ₂₀ 4%	T ₂₀ 10%	T ₈₀ 1%	T ₈₀ 4%	T ₈₀ 10%
1	3.6 ^a	0.0 ^a /0 ^b	3.1 ^a /86 ^b	3.3 ^a /91 ^b	1.0 ^a /27 ^b	0.7 ^a /19 ^b	1.1 ^a /21 ^b
2	3.6 ^a	1.3 ^a /36 ^b	2.2 ^a /61 ^b	3.3 ^a /91 ^b	1.4 ^a /38 ^b	0.4 ^a /11 ^b	1.3 ^a /36 ^b
3	3.6 ^a	2.0 ^a /46 ^b	2.7 ^a /75 ^b	2.9 ^a /80 ^b	2.1 ^a /58 ^b	0.8 ^a /22 ^b	2.1 ^a /58 ^b

TABLA 5 LIMITE MUESTRA 1

Numero de Muestras	Método de Recuento	Numero de Bacterias por g											
		< 10			10-100			100-1000			>1000		
		TSA	S.B	C V B	TSA	S.B	C.V B	TSA	S.B	C.V B	TSA	S.B	C.V B
Muestra 1	Placa	Aufc	Aufc		Aufc	Aufc		Aufc	Aufc		Aufc	Aufc	
	NMP			Aufc			Aufc			Aufc			Aufc
Muestra 2	Placa	Aufc	Aufc		Aufc	Aufc		Aufc	Aufc		Aufc	Aufc	
	NMP			Aufc			Aufc			Aufc			Aufc
Muestra 3	Placa	Aufc	Aufc		Aufc	Aufc		Aufc	Aufc		Aufc		
	NMP			Aufc			Aufc			Aufc			Aufc

Aufc:Ausencia total de unidaes formadoras de colonias
 NMP: Numero mas probable



TABLA 6 CONTROL DE AMBIENTE

Numeros de Ensayo	Método Recuento	Numero de Bacterias por m ²					
		Numero de Hongos por m ²					
		Dia 1		Dia 2		Dia 3	
		TSA	Saburaud	TSA	Saburaud	TSA	Saburaud
1	Placa	3ufc/m ²	2ufc/m ²	3ufc/m ²	3ufc/m ²	4ufc/m ²	5ufc/m ²
	Placa	3ufc/m ²	4ufc/m ²	4ufc/m ²	4ufc/m ²	4ufc/m ²	3ufc/m ²
2	Placa	3ufc/m ²	2ufc/m ²	7ufc/m ²	5ufc/m ²	5ufc/m ²	4ufc/m ²
	Placa	7ufc/m ²	4ufc/m ²	4ufc/m ²	5ufc/m ²	2ufc/m ²	5ufc/m ²
3	Placa	5ufc/m ²	3ufc/m ²	4ufc/m ²	3ufc/m ²	3ufc/m ²	6ufc/m ²
	Placa	4ufc/m ²	2ufc/m ²	2ufc/m ²	1ufc/m ²	4ufc/m ²	3ufc/m ²



ANÁLISIS DE RESULTADOS



Análisis De Los Resultados

Los resultados muestran el grado de recuperación y detección de microorganismos según el diluyente a distintas concentraciones utilizadas, tanto para el método de recuento en placa como para el análisis en tubos NMP; dándose el número y porcentaje de recuperación de las muestras que tienen menos de 10, de 10 a 100 de 100 a 1.000 y más de 1.000 bacterias por gramo o mililitro.

La mayor detección de la contaminación bacteriana se consiguió con diluyente de triptona sal al 10% de polisorbato 20, tanto para el método de placa como por el NMP en los tres microorganismos utilizados. Sin embargo no se muestran diferencias relevantes entre este (tween 20 al 4%) y tween 20 al 10%.

Al comparar los métodos de recuento se aprecia que el del NMP detecta en todos los casos mayor contaminación que el de la placa.

A su vez las muestras demostraron pasar las pruebas para límites establecidas, siendo esta un ensayo de importancia para asegurar la calidad de las muestras en estudio.



CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

El presente estudio concluye que el mejor diluyente utilizado en el análisis de medicamentos de uso tópico es el tween 20 al 10%, ya que permite el mejor porcentaje de recuperación de microorganismos que puedan haber presentes en la muestra en comparación con las muestras que fueron analizadas utilizando tween 20 (1% y 4%) y tween 80 (1%, 4% y 10%), pues no mostraron diferencias en cuanto al porcentaje de microorganismos recuperados.

Aunque lo ideal sería utilizar el diluyente más adecuado para cada muestra teniendo en cuenta su naturaleza y composición, esto no es posible cuando se estudian medicamentos de diversos tipos o cuando se desconoce su formulación, por eso en la práctica se emplea un solo diluyente. Por esta causa proponemos como mejor diluyente para el análisis microbiológico de los productos farmacéuticos hidrófilos de aplicación tópica triptona sal con 10% de polisorbato 20.

Consideramos que el medio de cultivo líquido es mejor que el medio sólido para la recuperación de los microorganismos dañados por las condiciones a las que se exponen generalmente los medicamentos durante el transporte, almacenamiento y presencia de conservadores en su formulación.



RECOMENDACIONES



RECOMENDACIONES

- Que el personal a cargo del área de microbiología evalúen, renueven y actualicen las técnicas de descontaminación de ambientes. A manera de observación se debe de mencionar que en el área estéril estuvieron trabajando 4 analistas lo cual puede ser un factor de contaminación que se reflejo en la tabla VI; se recomienda que en dicha área solo trabaje un analista a la vez y también que se coloque un filtro de aire para mejorar las condiciones de trabajo.
- Ensayar las técnicas descritas en el presente estudio para la detección y recuperación de hongos y levaduras lo cual no fue posible debido a la falta de reactivos para llevarse a cabo (Agar triptona con azolecitina glucosada y oxitetraciclina).
- Garantizar que las cepas utilizadas sea de tipo ATCC a fin de cuidar de la contaminación a los investigadores durante el ensayo.



Bibliografía

Referencias Generales.

- 1.Void, R. Bunschen M.
Tratado de Tecnología Farmacéutica (V. C. R).
Editado en Zaragoza España 1982.
Pag 483, 497-499.

- 2.8) Frobisher M, Hindill R.
Microbiología.
5ta edición, editorial Salvat S.A.
pag 208, 209, 475, 476, 514.

- 3.9) Jawetz Ernst.
Microbiología Médica.
Editorial el manual moderno S.A. de C.V.
Pag 32, 49, 50.

- 4.10) Farmacopea francesa-codex
Edición lengua española.
Pag 903, 904, 905.

- 5.Hardman J,
Goodmen Gilman Alfred.
Las bases Farmacologicas de la terapéutica.
Noena edición volumen II.
Pag 184-186.

- 6.Farmacopea de los Estados Unidos, Mexicanos.
Sexta edición 1994. Pag



7. Diccionario químico y productos químicos.

Gessner G. Hawley.

Ediciones omega S.A.

Pag 695

8. Farmacopea Europea.

Segunda edición. Parte volumen 3.

Pag

Información De Banco De Datos Y Artículos.

9. T09507 Antiviral activity of aqueous extracts from medicinal.

Plantas in tissue cultures.

May, g. Willuhn g.

Arz nerm-forsch 28 1.-7 (1978).

10. Bioactividad de productos naturales parte A.

Arta-ur-rahman 1993.

Pag 642, 645.



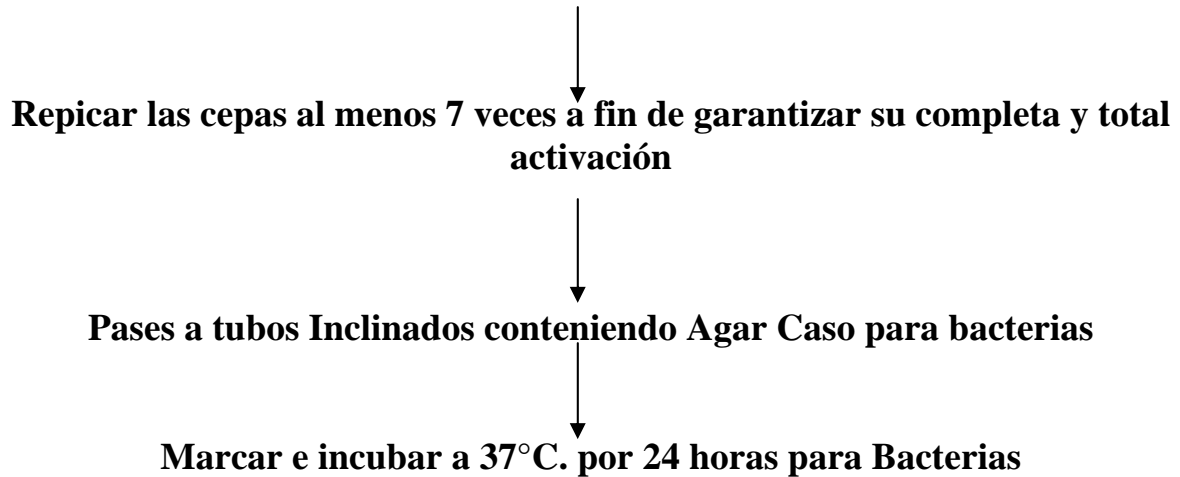
ANEXOS



ANEXOS

Anexo No 1 Cultivo de Microorganismos.

Cepas.ATCC





Anexo No. 2

PREPARACION DE LA SUSPENSION DE MICROORGANISMO

Se disuelve el microorganismo en volumen de solución salina al 0.9%



Luego se hacen diluciones necesarias hasta obtener una T de 25% a 580nm



A fin de establecer un numero de UFC estándar.

Suspensión para el ensayo previo a la inoculación de la muestra



Anexo No.3
TOMA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN DE LAS DESILUSIONES

Se tomaron 5 unidades físicas de cada especialidad farmacéuticas



Se tomo una muestra y se hizo el pool



Suspendiéndola en 90 ml de diluyente estéril



Homogenizar

Hacer diluciones sucesivas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} .



Anexo N°4.

Preparación de los medios de Cultivo.

Pesar 40 g. de A.caso



Disolver en 1 lt. de agua destilada recientemente hervida.



Calentar y agitar hasta lograr clarificar la solución.



Medir PH (7.3 ± 0.2)



Autoclavar por 15 minutos a 121°C.



Anexo N°5.

Preparación De La Solución Salina De Cloruro De Sodio 0.9%.

Pesar 0.9 G De Cloruro De Sodio.

↓
Disolver En 100 Ml. De Agua Destilada Estéril.

↓
Autoclavar Por 15 Minutos A 121°C.



ANEXO N°6.

Preparación de la suspensiones de microorganismos.

Tomar 2 a 3 asadas de microorganismo. en estudio



Disolver en tubos con solución salina al 0.9%.



Agitar hasta homogenizar la suspensión.



Medir en espectrofotómetro a 580 nm y 25% transmitancia esto es para ajustar la suspensión.



ANEXO N°7

Preparación de los platos petri para el ensayo

Dejar enfriar en baño María a 55°C el agar CASO previamente autoclavado.

↓
Vertir 9.9 ml. de agar +0.1 ml de muestra.

↓
Agitar para homogenizar la mezcla.

↓
Dejar enfriar a temperatura ambiente.



GLOSARIO



GLOSARIO

- **Criterio microbiológico:** el valor o la gama de valores microbiológicos, establecidos mediante el empleo de procedimientos definidos, para determinar la aceptación o rechazo del alimento muestreado
- **Parámetro microbiológico:** los análisis microbiológicos específicos practicados a cada alimento, tales como, microorganismos indicadores, microorganismos patógenos, toxinas, etc.
- **Indicador microbiológico:** a los microorganismos no patógenos pero
- frecuentemente asociados a éstos, utilizados para reflejar el riesgo de la presencia de agentes productores de enfermedades
- **Severidad del muestreo:** el rigor que se aplicará al muestreo. Depende del grado de riesgo para la salud y condiciones de uso posterior del alimento. Determina los planes de muestreo con respecto al número de unidades de muestras a ser examinadas (n), a la cantidad máxima de unidades defectuosas que puede contener la muestra (c) y al tipo de plan, 2 o 3 clases
- **Plan de muestreo:** el procedimiento en que se estipula el tamaño de la muestra (n), y el criterio de aceptación o rechazo (c), de forma que pueda tomarse una decisión respecto a si se debe aceptar o rechazar el alimento inspeccionado, basándose en los resultados del análisis
- **Plan de 2 clases:** un plan de muestreo, por atributos, donde la calidad de un producto de acuerdo con los criterios microbiológicos puede dividirse en dos grados de calidad, "aceptable" y "rechazable", basado en comprobar la presencia o ausencia de microorganismos, o si la tasa microbiológica es superior o inferior a un nivel crítico establecido ©. Un plan de 2 clases queda descrito por n y c
- **Plan de 3 clases:** un plan de muestreo, por atributos, donde la calidad de un producto, de acuerdo con los criterios microbiológicos puede dividirse en tres grados de calidad, "aceptable", "medianamente aceptable" y "rechazable". La clase aceptable tiene como límites 0 y m ; la clase medianamente aceptable tiene como límites m y M , y la rechazable aquellos valores superiores a M . Un plan de tres clases queda descrito por n , m , M y c
- **n** = número de unidades de muestras a ser examinadas;
- **m** = valor del parámetro microbiológico para el cual o por debajo del cual el alimento no representa un riesgo para la salud
- **c** = número máximo de unidades de muestra que puede contener un número de microorganismos comprendidos entre " m " y " M " para que el alimento sea aceptable
- **M** = valor del parámetro microbiológico por encima del cual el alimento representa un riesgo para la salud.
- **Categoría de riesgo:** la relación entre el grado de peligrosidad que representa el alimento para la salud en relación con las condiciones posteriores de manipulación.