

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
UNAN- LEON**

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

ESCUELA DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE ANALISIS DE DROGAS Y MEDICAMENTOS



**DETERMINACION DEL LIMITE MICROBIOLÓGICO AL JUGO DE
Morinda citrifolia L. (NONI) CON MAYOR DEMANDA EN
FARMACIAS Y/O CENTROS NATURISTAS DE LA CIUDAD DE
LEON. ENERO 2007.**

**MONOGRAFIA:
PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIADO QUIMICO
FARMACEUTICO**

AUTORES:

Br. ALLAN NOÉ ANDINO MEDINA
Br. WALTER MANUEL ESPINOZA LIRA
Br. ARIEL ANTONIO LAGOS VASQUEZ.

TUTOR:

Msc. Lic. LISSETH ARAÚZ

LEON, FEBRERO DEL 2007

AGRADECIMIENTO

DAMOS GRACIAS A:

Dios por ser el dador de la vida, nuestro refugio y fortaleza, que con su amor eterno nos ha acompañado a lo largo del camino.

Nuestros padres, quienes con mucho esfuerzo, sacrificio y amor incondicional han logrado darnos los estudios; herramientas necesarias para triunfar en la vida.

Los docentes, por compartir con nosotros sus conocimientos y experiencias en el lapso de nuestra formación profesional.

Nuestra tutora Lic. Liseth Araúz por brindarnos su tiempo, dedicación y estar siempre disponible para orientarnos en esta labor.

Todas las personas que en el transcurso de nuestra carrera nos brindaron la ayuda y el tiempo necesario para lograr culminar nuestros sueños.

DEDICATORIA

**Al que ilumina mi camino
La fortaleza de mi vida**

Dedico este trabajo monográfico a Dios Todopoderoso quien ha estado conmigo a diario, concediéndome bendiciones, salud, fuerza y sobre todo la sabiduría para poder realizar este trabajo, cumpliendo en mi su propósito.

A mi madre Francisca Medina por el esfuerzo, cariño y amor que me ha brindado desinteresadamente a lo largo de mi vida. Por ser una madre ejemplar, digna de mi amor y admiración. Gracias por educarme y estar a mi lado.

A mi hermano Adrián Andino quien ha mostrado su cariño y apoyo incondicional, siendo un digno ejemplo a seguir.

A mis amigos que siempre han estado a mi lado y me han motivado a seguir adelante.

Allan Noé Andino Medina

DEDICATORIA

**Al único que hace grandes
Maravillas,
Por que para siempre es su
Misericordia.**

Dedico la culminación de este trabajo monográfico primeramente a Dios por haberme permitido ir por el camino correcto a lo largo de esto 23 años y sobre todo por darme salud, inspiración y sabiduría, sin importar los obstáculos que se me presentaron en el camino, **Gracias Señor** por hacer realidad este sueño.

A la memoria de mi padre Julio Ulises Espinoza Pérez y en especial a mi madre Elsa del Rosario Lira Olivas por haberme brindado su cariño, dedicación y amor incondicional en todos los momentos de mi vida, la cual fue la fuente de inspiración para este proyecto.

A mi hermano Ulises Espinoza por ser ejemplo de superación, a mi Esposa Darling Irías e Hija Elisa Espinoza por su apoyo, comprensión y ternura, a mi tía Ana Lira por estar en los momentos buenos y malos de mi vida.

Walter Manuel Espinoza Lira

DEDICATORIA

**El que habita al abrigo del
Altísimo
Morara bajo la sombra del
Omnipotente.**

Dedico este trabajo monográfico a mi Dios por haberme guardado y protegido durante el transcurso de mi vida, por darme la sabiduría, fuerza y paciencia necesaria para alcanzar este sueño.

A mi madre Maura Isabel Vásquez Mairena por haber brindado su esfuerzo, dedicación y amor en todos los momentos de mi vida. Por cultivar en mí valores y principios que me han ayudado a ser mejor persona. Gracias a tu ayuda he podido culminar exitosamente mi carrera.

A todas las personas que de una u otra forma me han ayudado a salir adelante.

Ariel Antonio Lagos Vásquez

INDICE

	Página
I INTRODUCCION.....	1
II OBJETIVOS.....	2
III MARCO TEORICO.....	3
IV DISEÑO METODOLOGICO.....	25
V RESULTADOS.....	27
VI ANALISIS DE RESULTADOS.....	28
VII CONCLUSION.....	29
VIII RECOMENDACIÓN.....	30
IX BIBLIOGRAFIA.....	31
X ANEXOS.....	34

1. INTRODUCCION

La utilización de hierbas y plantas han sido empleados por siglos, en todo el mundo y en las diferentes culturas. A partir de que los beneficios del Noni se hicieron más conocidos, la comunidad científica comenzó a mostrar interés en estos productos. Los estudios han revelado las maravillosas cualidades de la fruta del Noni.

En nuestro país se introdujo a finales de la década del cuarenta como planta ornamental, la idea inicial era utilizar la planta como cortinas rompe-vientos para los cafetales en el Municipio de Masatepe y Masaya, quedando reducido posteriormente a la zona de la laguna de Masaya. Actualmente las zonas de mayor producción están concentradas en el Departamento de Chinandega, empezando a ser industrializado y comercializado de manera positiva debido a su amplia aceptación en el mercado Nacional y Centroamericano.

Se han realizado algunos estudios internacionales sobre *Morinda citrifolia* L., entre los más mencionados están:

1. La xeronina y la regeneración de las células; Dr. Ralph Heinicke Keronina.
2. Actividad anticancerígeno de la *Morinda citrifolia* L. en el carcinoma intraperitoneal de Lewis Lung implantado en ratones singénicos. A. Hirazumi, E. Furusawa, S.C. Chou & Y. Hokama, Proc. West. Pharmacol. Soc. 37: 145-146(1994).
3. Inducción de fenotipos normales en células transformadas RAS por Damnacanthal *Morinda Citrifolia*. T. Hiramaysu, M. Imoto, T.Koyano, K.Umezawa cartas sobre el Cáncer 73 (1993) 161-166. ⁽⁴⁾

En las fuentes bibliográficas consultadas se encontró en León un estudio sobre las características del jugo de Noni:

1. Determinación de Características Físicoquímicas del Extracto Natural Pausterizado a Base de *Morinda citrifolia* L. Cadena M, Soto M, Valladares F. León, Abril 2005.

En Nicaragua se han realizado pocos estudios sobre el Noni que se comercializa en los diferentes establecimientos farmacéuticos, se dispone de poca información sobre la seguridad y calidad de este fitofármaco. Es por este motivo que hemos considerado una necesidad social, realizar el límite microbiológico al jugo de Noni con mayor demanda en farmacias y/o centros naturistas de la ciudad de León.

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia L.* (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- ❖ Determinar el límite microbiano al jugo de *Morinda citrifolia L.* (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- ❖ Identificar la presencia de Bacterias Aerobias Mesófilas en el jugo de *Morinda citrifolia L.* (Noni).
- ❖ Determinar la presencia de Bacterias Patógenas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aureoginosa* y *Salmonella spp.*
- ❖ Identificar la presencia de Hongos y Levaduras en el jugo de *Morinda citrifolia L.* (Noni).

3. MARCO TEORICO

3.1 EL NONI.

Nombre científico: *Morinda citrifolia* Linn.

Nombre común: Noni

Etimología:

Morinda, del latín morus = mora e indo = relativo a la India, por el parecido del fruto a una mora y procedencia. ⁽²⁾

Citrifolia, del latín citrifolius-a-um = con hoja parecidas a las de un cítrico (Citrus). ⁽²⁾

Origen y distribución geográfica: Panamá, principalmente en las provincias de Bocas del Toro, Colón, y San Blas. Fuera de Panamá: Antillas (general), Asia, América Central (general), Oceanía (incluyendo Australia). Crece mejor en tierras vírgenes. ⁽⁴⁾

Importancia económica del Noni: Silvestre y cultivado comercialmente. El Noni usualmente es producido como: jugo, néctar, tabletas, cápsulas, jarabe y té. ⁽⁴⁾

Descripción: La planta de Noni florece en tierras vírgenes, generalmente cerca del mar. Puede llegar a crecer desde 10 a 20 pies. El árbol da frutos durante todo el año, y su flor es de color blanca. La fruta de Noni tiene aproximadamente 8 centímetros de diámetro, color amarillo a blanco; pulpa chocolate y densa. El Noni tiene un mal sabor y olor. ⁽⁴⁾

3.1.1 COMPONENTES QUIMICOS DEL FRUTO DEL NONI:

Alcaloides: El Noni tiene 10 diferentes alcaloides. Los alcaloides son bases orgánicas incoloras, complejas y amargas que son esenciales para mantener la vida.

Xeronina: Alcaloide que ocasiona una reacción en el núcleo de la célula en la síntesis de proteínas. La Xeronina y la Serotonina hacen que las personas se sientan mejor porque da más energía física y mental y por ende, ayuda a reducir las adicciones tales como alcoholismo, cigarrillo, drogas, etc.

Oligosacáridos: Es un tipo de azúcar que estimula la producción de xerotonina, antidepresivo, analgésico, somnífero, combate la migraña.

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

Flavonoides: El Noni tiene 10 flavonoides diferentes. Los flavonoides son las sustancias de pigmentación de las frutas y los vegetales. Ayudan en la reparación de los capilares, son antiinflamatorios y antivirus.

Quercitin: Flavonoide que repara las vasos sanguíneos y es antiinflamatorio. Mejora condiciones de várices y hemorroides.

Proxeroninasa: Ayuda en la digestión y absorción de nutrientes. Es también antiinflamatorio, ayuda particularmente en la inflamación de los órganos sexuales femeninos en condiciones como calambres, endometriosis, etc.

Antioxidantes: El Noni contiene varios antioxidantes que actúan impidiendo la acción de los radicales libres causantes del envejecimiento.

Damnacanthal: Inhibidor de la función RAS (Células Ras precursoras de muchos crecimientos malignos.).

Acido ascórbico: Excelente fuente de vitamina C.

Aminoácidos: Que incluye alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, cistina, glicina, ácido glutámico, histidina, leucidina, isoleucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

Agua.

Escopoletina: Dilata los vasos sanguíneos permitiendo el paso de sangre mas rápidamente, lo cual da como resultado niveles de presión más bajos. Además mata una variedad de especies bacterianas y se le considera como eliminadora del hongo *Pythium* sp. Se le han observado propiedades antiinflamatoria e inhibidora histamínica.

Glucosa.

Aceites esenciales. ⁽⁴⁾

3.1.2 APLICACIONES

La fruta de Noni es famosa por sus características beneficiosas para la salud. En análisis bromatológicos del Noni se ha detectado que es rico en elementos importantes de la alimentación humana:

Fibra, Proteínas, Hierro, Vitamina C, Calcio y Zinc ⁽⁴⁾

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia L.* (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

3.1.3 USOS FARMACOLOGICOS DEL NONI:

El Noni ha sido utilizado para tratar lo siguiente:

Sistema digestivo: Diarrea, parásitos intestinales, indigestión, úlceras estomacales.

Infecciones e inflamaciones de la piel: abscesos, carbunclos, forúnculos, abrasiones, barros, heridas e infecciones.

Afecciones internas: Diabetes, presión sanguínea elevada, dolor de cabeza, riñones y vejiga.

Problemas de los huesos y articulaciones: Artritis, fracturas y torceduras.

Infecciones bucales y de la garganta: Encías inflamadas y dolidas, garganta inflamada con tos, afta, gingivitis y dolor de muelas.

Infecciones respiratorias: Tos, tuberculosis, afecciones respiratorias y asma.

Efectos del envejecimiento: Se da como tónico saludable para tratar los efectos generales del envejecimiento.

Problemas de mujeres: Parto y preñez, calambres menstruales, regulación del flujo menstrual.

Fiebre: Fiebre con vómitos y gripe.

Otras afecciones: Problemas con los ojos y tumores. ⁽²⁾

3.1.4 ¿COMO FUNCIONA EL NONI?

1-PROXERONINA:

Este primer componente es una larga molécula. Se encuentra en algunos tejidos pero no es abundante en nuestro cuerpo por lo que se debe proveer por medio de una dieta. La Proxeronina se encuentra disponible en el fruto de la planta *Morinda Citrifolia L.* comúnmente llamada Noni, en cantidades importantes, siendo la mejor fuente de Proxeronina conocida hasta ahora.

2-PROXERONINASA:

El Segundo componente, la enzima llamada proxeroninasa, se encuentra en forma abundante en nuestro cuerpo y además se encuentra disponible en gran variedad de frutas y vegetales. No solo se encuentra dentro del cuerpo sino también en la superficie de la piel.

3-REACCION DE LOS COMPONENTES:

Al tomar el Jugo de Noni, se ubican los dos componentes anteriores en el cuerpo, la proxeronina y la proxeroninasa. La fase está lista para la producción de Xeronina.

4-EMPIEZA EL PROCESO:

Dentro del cuerpo el proceso de producción de la Xeronina comienza por la combinación de la Proxeronina con la Proxeroninasa.

5-PROXERONINA SE ENLAZA:

La molécula alargada de Proxeronina se enlaza con la enzima proxeroninasa.

6-UN SOLO CUERPO:

Después de un proceso químico complejo, los extremos de la molécula alargada de proxeronina se sueldan para formar un cuerpo sólido.

7-XERONINA:

La cadena central que se forma se corta y se separa formando así la Xeronina.

8-PROTEINAS:

Sin la Xeronina, las proteínas formadas de las conexiones entre aminoácidos, se encuentran inactivas. Las proteínas son esenciales para la vitalidad de las células dentro de nuestro cuerpo. Solamente cuando se combinan con la xeronina se convierten en componentes activos para la salud y el bienestar de nuestro cuerpo.

9-RECEPTACULO:

Cada proteína, tal y como es formada, crea un receptáculo adecuado para aceptar la xeronina. Hasta hace muy poco tiempo, una fuente comprobada de proxeronina no se conocía.

Los alimentos convencionales debido a la reducción de impurezas y a los procesos de producción, adolecen de los niveles necesarios de proxeronina.

Así que vemos que de la combinación de la proxeronina, componente que debe estar suministrado por el consumo de alimentos y que se encuentra en abundancia en el Jugo de Noni y la proxeroninasa, enzima que se encuentra en nuestro cuerpo abundantemente, resulta la xeronina que es un ingrediente esencial para nuestra salud y nuestro bienestar.

10-HERRAMIENTA PODEROSA:

Cuando se combina con la xeronina, se convierte la proteína en una herramienta poderosa para la estructura de nuestro cuerpo ya que produce energía y envía señales químicas entre las células para su normal crecimiento y mantenimiento.

La producción de xeronina es un proceso delicado y complejo que si llega a faltar una pequeña parte, se desestabiliza; es decir que si falta la proxeronina que es de por si escasa y el más importante de los componentes en este proceso, entonces nada ocurre. ⁽⁴⁾

3.1.5 EFECTOS SECUNDARIOS O NEGATIVOS DEL NONI

En general, no se conocen efectos secundarios o negativos del Noni, pero siempre existe la posibilidad que una persona reaccione diferente a otra.

La primera vez que se consume Noni, hay que tener en cuenta que puede haber un efecto leve de soltura intestinal. Se ha reportado que el Noni puede causar estreñimiento en caso de tomarlo en exceso. Se recomienda que cada tres meses, se deje de consumir Noni por 10 días, antes de consumir de nuevo. ⁽⁴⁾

Al Tomar grandes cantidades de jugo de Noni o por períodos prolongados se aumentan las concentraciones de potasio en sangre lo cual es perjudicial en pacientes con dietas de bajo nivel de potasio y pacientes con función renal disminuida.

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

Síntomas Clínicos de Hiperpotasemia

Localización	Síntomas
Sistema Músculo-Esquelético	Parestesias Debilidad muscular Parálisis flácida Parada Respiratoria
Corazón	Alteraciones ECG: -Ondas T altas y picudas en derivaciones precordiales (K \geq 6,5mEq/l) - Prolongación espacio PR (K: 7-8 mEq/l) - Pérdida de onda P (K: 7,5-8mEq/l) - Ensanchamiento QRS (K: 7,5- 8mEq/l) - QRS converge con onda T (K >8m Eq/l) - Fibrilación ventricular - Parada cardiaca - Arritmias ventriculares (cualquier concentración)
Sistema Renal	Acidosis Tubular Renal tipo IV Inhibe amoniogénesis renal Inhibe la reabsorción de amoníaco
Sistema Endocrinológico	Estimulación de aldosterona Inhibición de renina Estimulación de insulina Estimulación de glucagón

3.2 PASTEURIZACION

3.2.1 CONCEPTO:

Tratamiento que consigue la destrucción de microorganismos sensibles al calor. Su nombre se debe a Luis Pasteur, que utilizó el calor por primera vez para controlar el deterioro del vino. Pasteurización no es sinónimo de esterilización, por que no destruye a todos los microorganismo.

En la pasteurización se emplean temperaturas inferiores a 100 °C, suficiente para destruir las formas vegetativas de un buen número de microorganismos patógenos y saprofitos. Las bacterias esporuladas y otras denominadas termodúricas resisten, normalmente, a este proceso. Muchos alimentos, sobre

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

todo bebidas, se pasteurizan; la leche es el ejemplo más clásico. Sin embargo, los alimentos pasteurizados son inocuos debidos a la posibilidad que contengan

microorganismos supervivientes, su caducidad es corta y requieren ser conservados en frío.

En los Estados Unidos, la Federación de Drogas y Alimentos (FDA) recomienda que todos los jugos de frutas sean pasteurizados. Actualmente el 98 % de los jugos en los Estados Unidos son pasteurizados para matar cualquier bacteria dañina que podría haber crecido durante el proceso de recolección del fruto o de embotellamiento.

Si el jugo no lo está, la ley requiere que ese producto contenga una nota advirtiendo el peligro de bebidas no pasteurizadas. ⁽²⁾

3.2.2 TECNICAS DE PASTEURIZACION

Son diversas las técnicas de pasteurización. La elección del sistema a utilizar depende esencialmente del número inicial de gérmenes y de si se trata de lograr la esterilización total o sólo la reducción del contenido microbiano. La elección de la técnica a seguir se ve también influenciada por las cantidades a procesar, puesto que no es lo mismo pasteurizar 20 litros de mezcla de jugo que una de 600 o más litros por hora.

En cualquier caso, el sistema elegido para reducir el contenido microbiano de la mezcla debe cumplir los requisitos siguientes:

- El efecto germicida (porcentaje de gérmenes destruidos o eliminados) ha de superar al 99 % y si se trata de gérmenes patógenos debe ser el 100 %.
- La mezcla debe ser tratada con moderación para que conserve en la mayor medida posible sus principios nutritivos, así como sus propiedades organolépticas.
- La rentabilidad del sistema debe ser alta y el gasto en aparatos, escaso.

La denominada pasteurización baja o lenta es la que mejor responde al principio conservador del valor nutritivo de la mezcla. En este caso, la temperatura alcanzada oscila, según el sistema, entre los 62 °C y los 72 °C y la duración del calentamiento de 8 a 40 segundos. El efecto germicida es alto, del orden del 95 % al 99 %.

La pasteurización rápida es la empleada con mayor frecuencia. Cumple casi totalmente todos los requisitos. Entre las modificaciones químicas, cabe citar la coagulación de escasas cantidades de albúmina y globulina, así como la precipitación reducida de sales. Las vitaminas apenas se modifican.

La temperatura alcanzada se mueve entre 71 °C y 74 °C y el calentamiento suele durar de 40 a 45 segundos. El efecto germicida medio es del 99,5 %. La pasteurización alta es la preferida por su elevado efecto germicida (99,9 %).

Las modificaciones físicas y químicas, sin embargo, son bastante más acusadas que en la pasteurización rápida, pues la mayoría de los fenómenos de desnaturalización se producen por encima de 75 °C. Las pérdidas de las vitaminas A, B1 y C se limitan no obstante al 20%. La temperatura que se alcanza es de 85 °C durante un período de 8 a 15 segundos. La forma extrema de este sistema es la ultrapasteurización, con temperaturas de entre 135 °C y 150 °C y un tiempo de exposición de 2 a 8 segundos. El efecto germicida supera igualmente el 99,9%.

Las distintas técnicas no deben confundirse con la esterilización, mecanismo que persigue la eliminación total de patógenos mediante el uso de altas temperaturas (superiores a los 110 °C) en lapsos de tiempo prolongados, entre 20 y 35 minutos. Aunque el producto final queda absolutamente libre de patógenos, las cualidades organolépticas se verán sustancialmente modificadas por el proceso. ⁽¹¹⁾

3.3 METODOS DE PROCESAMIENTO DEL NONI

Existen muchas maneras como los productos Noni son procesados y traídos al mercado. Los métodos más comunes serán explorados a continuación.

1. El método de jugo:

El jugo de noni es recolectado cuando está maduro o remaduro, casi por podrirse. El fruto es puesto en largas telas metálicas para que el jugo gotee y sea recolectado por medio de tubos.

El jugo es limpiado, y embotellado sin añadir sabores, azúcares ni espesadores. Estos productos normalmente ponen "100 % puro jugo Noni" en sus etiquetas.

2. El método de Puré:

El fruto entero es usado para crear el jugo. Tal como con el método de 100 % jugo Noni, el fruto es colectado completamente maduro. El jugo es machucado finamente, las semillas son extraídas, y el fruto es hecho un puré líquido. Ya que este puré es grueso, es necesario usar jugos con sabores para hacerlo líquido, con buen sabor, y con la correcta consistencia antes de embotellarlo. Este producto debe de pasar por un proceso de pasteurización para mayor seguridad.

3. Las Tabletas y Cápsulas:

El fruto Noni es colectado cuando está maduro. El fruto pasa por un proceso de deshidratación o secado que remueve la mayoría del agua contenida en el fruto. El fruto típicamente pasa por un proceso de radiación para matar las bacterias dañinas. El producto es hecho polvo y puesto ya sea en cápsula o tableta.

4. Jugo de Noni hecho de Noni en polvo:

El jugo noni es generalmente recolectado cuando está maduro. Para remover la mayor parte del agua este es deshidratado, posteriormente es irradiado y hecho polvo para añadirlo a soluciones líquidas con agentes saborizantes, azúcares y espesadores. ⁽²⁾

3.4 FACTORES DETERMINANTES DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA.

Intrínsecos:

- Naturaleza de la planta y barreras naturales.
- Estructura de la planta.
- Composición de la planta (compuestos antimicrobianos).
- Contaminación intracelular microbiana.

Extrínsecos:

- Clima.
- Humedad.
- Ubicación/Posición.
- Método de cosecha.
- Postcosecha.
- Estado físico.
- Tratamiento tecnológico.
- Empaque/Almacenaje.
- Contaminación bacteriana exógena. ⁽³⁾

3.5 ANALISIS MICROBIOLÓGICO.

Entendemos por cultivo de microorganismo el proceso que induce su crecimiento. Para cumplir la mayoría de las finalidades de la microbiología, se cultivan in Vitro (del latín vitrum = vidrio), es decir, en matraces, tubo de ensayo y otros recipientes de vidrio. En la actualidad los frascos de cultivos pueden ser de plástico o acero.

Para este tipo de cultivo es indispensable la preparación de soluciones, u otras formas de materiales que los microorganismos pueden utilizar como alimento. ⁽³⁾

Mesófilos:

Muchas especies del suelo, del agua y del cuerpo crecen bien a temperaturas que oscilan entre 10 y 45 °C. No obstante sus temperaturas óptimas de crecimiento son cerca de 30 a 45 °C. y varían según las especies. Las que se desarrollan bien se denominan mesófilas (del griego Meso = mitad o medio, Philie = a elegir).

Aerobio:

Microorganismo capaz de crecer o metabolizar en presencia de oxígeno libre.

Anaerobio:

Se dice del microorganismo capaz de crecer o de metabolizar en ausencia de oxígeno libre, puede ser obligado (es decir morirán en presencia de oxígeno) u facultativo (crece en ausencia o presencia de oxígeno).

Los microorganismos para su estudio se agrupan en el reino protista y al clasificarlos se mantiene la clasificación hecha por D. Bergeys, que los ubica en familias, tribus, género. ⁽³⁾

Para este estudio resulta de interés las familias:

- ❖ Enterobacteriaceae
- ❖ Microcaceae.
- ❖ Pseudomonadaceae.
- ❖ Hongos verdaderos.

Familia Enterobacteriaceae:

Los microorganismos integrantes de estas familias se distinguen porque en su mayoría habitan en el conducto intestinal del hombre y animales inferiores de ahí su nombre.

Son fermentadoras activas de la glucosa y lactosa, reducen los nitratos a nitritos, fácilmente cultivables en una gran variedad de medios, a temperaturas que oscilan entre 25 °C.-37 °C. Las especies móviles están flageladas de modo peritrico, algunos microorganismos de la familia producen pectinasa; evidentemente no se puede utilizar una sola prueba bioquímica, o una propiedad fisiológica única para identificar a cualquier miembro de la familia.

Forma bacilar no esporogénea, son Gram negativos, aerobios, algunas especies son patógenas primarias peligrosas, que ocasionan fiebre tifoidea, disentería, diarrea infantil e infecciones del conducto urinario y otros órganos, además existen otras especies parásitas de plantas que provocan marchites y podredumbres ligeras.

Los géneros que integran estas familias son: *Escherichia*, *Aerobacter*, *Salmonella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Proteus*, *Shiguella*, *Clebsiella*, *Peptobacterium*.

Género *Escherichia*:

Es un género muy esparcido en la naturaleza, entre su especie la más importante es la *Escherichia coli* que es la especie más genuinamente fecal, y se encuentra siempre en el conducto intestinal del hombre y de los animales, es por eso que su presencia en los alimentos o en las aguas potables puede ser inicio de contaminación fecal.

La *Escherichia coli* puede causar más problemas graves al invadir la vejiga urinaria y la pelvis renal produciendo cistitis, y pielitis respectivamente. ⁽³⁾

Género *Salmonella*:

El género *Salmonella* consiste en células de forma bacilar habitualmente móviles capaces de utilizar el citrato como fuente de carbono; la mayoría de estas cepas son aerógenas.

Además uno de los más importante de la familia reúne muchas especies patógenas que provocan enfermedades tales como: Tifus, alteraciones gastrointestinales (Salmonelosis), septicemia (invade la sangre), fiebre tifoidea y paratifoidea, etc.

Salmonelosis: Enfermedades provocadas por *Salmonella* que va desde un dolor intestinal leve hasta una enfermedad fatal.

Dentro de las características diferenciales de la *Salmonella* utilizaremos como ejemplo la *Salmonella thypi*, siendo esta: xilosa variable; tehalosa y sulfuro de hidrógeno positivo; arabinosa, agar citrato y gas en dextrosa, indol negativo. ⁽³⁾

Familia Microcaceae:

Las microcaceae son gram positivos, no formadores de esporas y principalmente saprofitas que viven libremente, suelen ser esféricas o esferoidales y se dividen típicamente en dos o tres plantas, algunas veces formando acúmulo o

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

masas de cocos semejantes a racimos de uva o bien grupos aplanados cuadrados de cuatro elementos.

La familia incluye los géneros *Micrococcus*, *Sarcinas*, *Staphylococcus*, *Methanococcus* y *Peptococcus*.

Género *Staphylococcus*:

Este género microscópicamente suele confundirse con *Micrococcus*, su representante forma masas irregulares, aunque casi siempre se agrupa en racimos. La diferencia entre estos géneros se aprecia en la capacidad que tiene *Staphylococcus* de fermentar o utilizar la glucosa, el manitol y el piruvato en condiciones anaerobias. De ahí se plantea que esta familia agrupa microorganismos aerobios facultativos.

Se encuentra frecuentemente en la piel, membranas, mucosa de nariz y boca, heridas infectadas, etc. Donde aparecen en grandes cantidades aún en condiciones normales.

Hay dos especies principales: el *Staphylococcus aureus* que se distingue por su pigmento dorado, es notorio como productor de enfermedades supurativas. El *Staphylococcus epidermidis* es menos patógeno o comensal de la piel y de las membranas mucosas.

Dentro de las características diferenciales podemos mencionar las correspondientes al *Staphylococcus epidermidis* las cuales son las siguientes: no fermenta el manitol, ni produce coagulasa, toxina alfa o lipasa; la licuefacción de la gelatina es lenta o no existe; la hemólisis es discreta o ausente.⁽³⁾

Familia Pseudomonadaceae:

Son de origen marino y toleran altas concentraciones de sal. Numerosas especies de estas familias producen pigmentos azules, verdes y amarillos, soluble en el agua y difusible y a veces fluorescentes.⁽³⁾

Género *Pseudomonas*:

Es una bacteria polimorfitas gram negativa, móvil, es aerobio obligado, se desarrolla a temperaturas óptimas de 37 °C. pero incluso puede crecer a los 40 - 41 °C. Sucumbe a 60 °C. a una hora, es sensible a los desinfectantes.

En condiciones naturales la *Pseudomona aeruginosa* habita en el suelo, el agua y las plantas, pero a veces se aísla en los pacientes con quemaduras, así como en las heridas infectadas y en la uretra.

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

En el hombre provoca procesos supurativos locales o generalizados: otitis, pielitis, cistitis, queratitis, meningoencefalitis y septicemia. Los niños pequeños y debilitados son los más susceptibles a la infección por *Pseudomonas*. En los enfermos afectados por esta bacteria el pus y las vendas se colorean de azul verdoso. ⁽³⁾

3.6 LIMITE MICROBIANO

Los ensayos de control sobre la contaminación microbiana deben entenderse tanto de forma cuantitativa como cualitativa. Según esto, en los medicamentos y cosméticos no deben de haber agentes de enfermedades (especies patógenas), y el contenido de saprofitos no debe de sobrepasar los valores límites definidos, para evitar variaciones de un medicamento y/o un cosmético en cuanto a su aspecto, sabor, olor, estabilidad, consistencia, descomposición, intolerancia, disminución de actividad y otros.

El Límite Microbiano es un conjunto de pruebas cuyo objetivo es evaluar la calidad sanitaria de los productos farmacéuticos (materias primas, productos intermedios y terminados), mediante el recuento de organismos mesófilos, hongos filamentosos y levaduras; así como la investigación de microorganismos objetables en dichos estudios. ⁽³⁾

3.6.1 FACTORES QUE AFECTAN EL LÍMITE MICROBIANO:

Temperatura de las incubadoras:

La temperatura a la cual son sometidos los platos con los medios específicos para el crecimiento de los microorganismos es de mucha importancia ya que un aumento o disminución de ésta puede impedir el crecimiento por no presentar condiciones óptimas para su desarrollo. ⁽³⁾

pH para los medios de cultivo:

De igual forma una variación ya sea aumento o disminución del pH óptimo de un microorganismo interfiere de forma significativa en el desarrollo de éstos, por tanto se debe comprobar el pH del medio al cual se va a someter una muestra. ⁽³⁾

Deficiente lavado y esterilización de las cristalerías:

El lavado y la posterior esterilización de la cristalería en la cual se va a trabajar debe hacerse de forma eficiente, bajo condiciones asépticas de modo que no queden residuos de cloro y detergente ya que estos pueden interferir en el crecimiento de los microorganismo o provocar resultados erróneos.

El tiempo transcurrido desde la primera dilución hasta su incorporación en los medios de cultivos no debe de exceder a una hora. ⁽³⁾

3.6.2 SOLUCION AMORTIGUADORA Y MEDIOS

Los medios de cultivos pueden prepararse como se indica a continuación, o bien pueden utilizarse medios de cultivo deshidratados, siempre y cuando una vez reconstituidos según las indicaciones del fabricante o del distribuidor, contengan ingredientes similares y constituyen medios comparables a los obtenidos con las fórmulas proporcionadas aquí.

Para preparar medios según las fórmulas que se describen aquí, disolver los sólidos solubles en el agua, utilizando calor si fuera necesario, para lograr una disolución completa y agregar soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio en cantidades suficientes para obtener el pH deseado en el medio cuando esté listo para ser utilizado. Determinar el pH a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cuando la fórmula requiera agar, utilizar agar que no contenga más de 15 % de humedad. Cuando la fórmula requiera agua, utilizar Agua Purificada. ⁽¹⁾

3.6.3 SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATO DE pH 7.2

Solución madre/disolver 34 g de fosfato monobásico de potasio en aproximadamente 500 ml. de agua en un matraz volumétrico de 1000 ml. Ajustar a un pH de 7.2 ± 0.1 agregando hidróxido de sodio SR (aproximadamente 175 ml.), agregar agua a volumen y mezclar. Verter en recipientes y esterilizar. Almacenar bajo refrigeración. Para su uso diluir la Solución Madre con agua en una proporción de 1 a 800 y esterilizar. ⁽¹⁾

3.6.4 MEDIOS

A menos que se indique algo diferente en la etiqueta del medio de cultivo, éstos deben esterilizarse en un autoclave de 15 a 20 minutos a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los medios utilizados son:

1. Medio Líquido de Digerido de Caseína-Lecitina de Soja-Polisorbato 20.
2. Medio Agar con Digerido de Caseína-Soja.
3. Medio Líquido de Digerido de Caseína-Soja.
4. Medio Manitol-Agar Salado.
5. Medio Agar de Baird-Parker.
6. Medio Agar de Vogel-Johnson.
7. Medio Agar Cetrimida.
8. Medio Agar Pseudomonas para la Detección de Fluorescina.
9. Medio Agar Pseudomonas para la Detección de Píocianina.
10. Medio Líquido de Lactosa.

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

11. Medio Líquido de Selenio-Cistina. ⁽¹⁾

3.6.5 MUESTREO

Proporcionar muestras de 10 ml. o 10 g. para cada una de las pruebas requeridas en la monografía correspondiente. ⁽¹⁾

3.6.6 PROCEDIMIENTO

Preparar la muestra que se desea analizar con un tratamiento apropiado a sus características físicas y que no altere el número y tipo de microorganismos presentes originalmente, a fin de obtener una solución o suspensión de la totalidad o parte de la muestra que sea adecuada para el o los procedimientos de prueba que se deben llevar a cabo.

En el caso de sólidos que se disuelven en gran medida pero no totalmente, reducir la sustancia a un polvo moderadamente fino, suspenderlo en el vehículo especificado y proceder según se indica en Recuento Total de Microorganismos Aerobios y en Prueba para determinar la ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y prueba para determinar la ausencia de *Salmonella spp* y *Escherichia coli*.

En el caso de muestras líquidas que consisten en una solución verdadera o una suspensión en agua o un vehículo hidroalcohólico que contenga menos de 30 % de alcohol, y para aquellos sólidos de disolución fácil y casi total en 90 ml. de Solución Amortiguadora de Fosfato de pH 7.2 o en los medios especificados, proceder según se indica en Recuento Total de Microorganismos Aerobios y en Prueba para determinar la ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y Prueba para determinar la ausencia de *Salmonella spp* y *Escherichia coli*.

En el caso de ceras, cremas, ungüentos y líquidos inmiscibles con agua, preparar una suspensión con ayuda de una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril adecuado, utilizando un mezclador mecánico y calentando a una temperatura que no exceda de 45 °C, si fuera necesario, y proceder con la suspensión según se indica en Recuento Total de Microorganismos Aerobios y en prueba para determinar la ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y prueba para determinar la ausencia de *Salmonella spp* y *Escherichia coli*.

Para una muestra líquida en forma de aerosol, enfriar el envase en una mezcla de alcohol y hielo seco durante aproximadamente 1 hora, abrir el envase, dejar que alcance temperatura ambiente, dejar que el propelente escape, o entibiar para expulsar el propelente si fuera factible, y transferir la cantidad de material de prueba requerida para los procedimientos especificados en uno de los dos párrafos precedentes, según corresponda.

Cuando no se pueden obtener 10 g o 10 ml. de la muestra, según corresponda, de 10 envases en forma de aerosol, transferir la totalidad del contenido de 10 envases enfriados al medio de cultivo, dejar que el propelente se escape y proceder a realizar la prueba a los residuos. Si los resultados de la prueba no fueran concluyentes o dudosos, repetir la prueba con una muestra de 20 envases más. ⁽¹⁾

3.6.7 RECuento TOTAL DE MICROORGANISMOS AEROBIOS

En el caso de muestras que son lo suficientemente solubles o translúcidas para permitir el uso del Método en Placa, usar dicho método; de lo contrario, usar el Método en tubos Múltiples. Con cualquiera de los métodos, primero disolver o suspender 10 g de la muestra si es sólida, o 10 ml, medidos con exactitud, si la muestra es líquida, en Solución Amortiguadora de Fosfato de pH 7.2, Medio Líquido Digerido de Caseína-Soja o Medio Líquido de Digerido de Caseína-Lecitina de Soja-Polisorbato 20 para obtener 100 ml. En el caso de muestras viscosas que no se puedan pipetear y transferir a esta dilución inicial de 1:10, diluir la muestra hasta obtener una suspensión, es decir, 1:50 ó 1:100, etc., que pueda pipetearse. Realizar la prueba para determinar la ausencia de propiedades inhibitoras según se describe en Pruebas Preparatorias antes de determinar el Recuento Total de Microorganismos Aerobios. Agregar la muestra al medio a más tardar 1 hora después de preparar las diluciones apropiadas para inoculación. ⁽¹⁾

3.6.8 METODO EN PLACA

Diluir el líquido aún más, si fuera necesario, para que 1 ml. permita obtener entre 30 y 300 colonias. Pipetear 1 ml. de la dilución final y transferir a dos placas de Petri estériles. Agregar de inmediato, a cada placa, de 15 a 20 ml. de Medio Agar Digerido de Caseína-Soja, previamente fundido y enfriado aproximadamente a 45 °C. Cubrir las placas de Petri, mezclar la muestra con agar inclinando ligeramente o rotando suavemente las placas y dejar que el contenido se solidifique a temperatura ambiente. Invertir las placas de Petri e incubar durante 48 a 72 horas. Una vez finalizada la incubación, examinar las placas para verificar el crecimiento de microorganismos, contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en término del número de microorganismos por g. o por ml. de la muestra. En caso de no recuperarse colonias microbianas de las placas que representen la dilución inicial 1:10 de la muestra, expresar los resultados como menos de 10 microorganismos por g o por ml. de muestra. ⁽¹⁾

3.6.9 METODO EN TUBOS MULTIPLES

En cada uno de los 14 tubos de ensayo de tamaño similar, colocar 9 ml de Medio Líquido de Digerido de Caseína-Soja. Distribuir doce de los tubos en cuatro

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

grupos de tres tubos de cada uno. Separar un grupo de tres tubos para utilizarlo como control. Pipetear 1 ml. de la solución o suspensión de la muestra y transferir a cada uno de los tres tubos de un grupo (100) y a un cuarto tubo (A), y mezclar. Pipetear 1 ml. del tubo A y transferir al tubo restante (B), no incluido en un grupo y mezclar. Estos dos tubos contienen 100 mg (o 100 µl) y 10 mg (o 10 µl) de la muestra, respectivamente. Pipetear 1 ml del tubo A y transferir a cada uno de los tres tubos del segundo grupo (10) y pipetear 1 ml. del tubo B y transferir a cada tubo del tercer grupo (1). Desechar el contenido no utilizado de los tubos A y B. Cerrar bien e incubar todos los tubos.

Una vez transcurrido el período de incubación, examinar los tubos para verificar el crecimiento de los microorganismos: los tres tubos de control se mantienen transparentes y los resultados observados en los tubos que contienen la muestra, interpretados según la tabla 1, indican el número más probable de microorganismos por g o por ml de muestra. ⁽¹⁾

Tabla 1. Recuento Total Más Probable por el Método en Tubos Múltiples

Combinaciones Observadas de Número de Tubos que Evidencian Crecimiento en cada Grupo.			Número más probable de microorganismos por g o por ml.
No de mg (o ml) de Muestra por tubo			
100 (100 µl)	10 (10 µl)	1 (1 µl)	
3	3	3	>1100
3	3	2	1100
3	3	1	500
3	3	0	200
3	2	3	290
3	2	2	210
3	2	1	150
3	2	0	90
3	1	3	160
3	1	2	120
3	1	1	70
3	1	0	40
3	0	3	95
3	0	2	60
3	0	1	40
3	0	0	23

3.6.10 PRUEBA PARA *Staphylococcus aureus* Y *Pseudomona aeruginosa*.

Agregar Medio Líquido de Digerido de Caseína-Soja a la muestra para obtener 100 ml, mezclar e incubar. Examinar el medio para verificar el crecimiento y si hubiera crecimiento, utilizar un asa de inoculación para realizar estrías con una porción del medio sobre la superficie del Medio Agar de Vogel-Johnson (o Medio

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

Agar de Baird-Parker o Medio Manitol Agar Salado) y del Medio Agar Cetrimide, cada uno de ellos colocados en placa petri. Cubrir las placas, invertirlas e incubar. Si al examinarlas ninguna de las placas contiene colonias con las características enumeradas en la tabla 2 y 3 para los medios utilizados, la muestra de prueba cumple con los requisitos de ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.⁽¹⁾

Prueba de coagulasa (para *Staphylococcus aureus*): Con la ayuda de un asa de inoculación transferir colonias sospechosas representativa desde las superficies de Agar del Medio Vogel-Johnson (o Medio Agar de Baird-Parker o Medio Manitol Agar Salado) a tubos individuales, que contengan cada uno 0.5 ml de plasma de mamífero, preferentemente de conejo o caballo, con o sin aditivos adecuados. Incubar en un baño de agua a 37 °C, examinando los tubos a las tres horas y posteriormente a intervalos adecuados hasta 24 horas.

Analizar los controles positivos y negativos simultáneamente con las muestras desconocidas. Si no se observa ningún grado de coagulación la muestra cumple con los requisitos para confirmar la ausencia de *Staphylococcus aureus*.⁽¹⁾

Prueba de oxidasa y de pigmentos (para determinar la ausencia de *Pseudomona aeruginosa*): Con la ayuda de un asa de inoculación realizar estrías de las colonias sospechosas representativas, tomadas de la superficie de Agar del Medio Agar Cetrimida, sobre las superficies de agar del Medio Pseudomonas, Agar para la Detección de Fluorescina y del Medio Pseudomona Agar para la Detección de Piocianina contenida en la placa de petri.

Si debe transferirse un número grande de colonias sospechosas, dividir la superficie de cada placa en cuadrantes e inocular cada uno con una colonia diferente. Cubrir las placas, invertir el medio inoculado e incubar a 35 °C ± 2 °C durante no menos de tres días. Examinar las superficies estriadas bajo luz U.V. Examinar las placas para determinar colonias presentes con las características enumeradas en la tabla 3.

Por medio de la prueba de oxidasa confirmar si un crecimiento de colonia sospechosa en uno o más medios corresponde a *Pseudomona aeruginosa*. Una vez que haya tenido lugar el crecimiento de colonias colocar o transferir las colonias a tiras o discos de papel de filtro que se han impregnado previamente con diclorhidrato N,N-dimetil-p-fenilendiamina: si no aparece un color rosado, que se torna púrpura, la muestra cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *Pseudomona aeruginosa*. La presencia de *Pseudomona aeruginosa* se puede confirmar mediante otra prueba bioquímica y de cultivo adecuadas, si fueran necesarios.⁽¹⁾

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

Tabla 2. Características Morfológicas de Staphylococcus aureus en Medio Agar Selectivo.

Medio Selectivo	Morfología Característica de las Colonias	Tinción de Gram.
Medio Agar de Vogel-Johnson	Negro, rodeado de una zona amarillas	Cocos positivos (en grupos)
Medio Manitol Agar Salado	Colonias amarillas con zonas amarillas	Cocos positivos (en grupo)
Medio Agar de Baird-Parker	Negro, brillante, rodeado de zonas transparentes de 2 mm a 5 mm	Cocos positivos (en grupos)

(1)

3.6.11 PRUEBA PARA DETERMINAR LA AUSENCIA DE *Salmonella* spp Y *Escherichia coli*.

Agregar a la muestra que está contenida en un vaso adecuado, un volumen de medio líquido de lactosa para obtener 100 ml e incubar. Examinar el medio para verificar el crecimiento y, si hubiera crecimiento, mezclar agitando suavemente. Pipetear porciones de 1 ml y transferir a vasos que contengan, respectivamente, 10 ml de Medio Líquido de Selenito-Cistina y de Medio Líquido de Tetracionato, mezclar e incubar durante 12 a 24 horas (conservar el remanente del medio líquido de lactosa).⁽¹⁾

Prueba para determinar la ausencia de *Salmonella* spp: por medio de un asa de inoculación, realizar estrías de los Medios de Selenito-Cistina y de Tetracionato sobre la superficie del medio Agar Verde Brillante, del medio Agar con Xilosa-Lisina-Desoxicolato y del medio Agar con Sulfito de Bismuto contenido en placas de petri. Cubrir las placas, invertirlas e incubar. Al examinar las placas, si ninguna de las colonias se ajusta a la descripción que aparece en la tabla 4. la muestra cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia del género *Salmonella*.

Tabla 4. Características morfológicas de *Salmonella* spp en medio agar selectivo.

Medio selectivo	Morfología características de las colonias
Medio agar Verde brillante	Pequeñas, transparentes, incoloras o de color rosado a blanco opaco (frecuentemente rodeadas por una zona de color rosado a rojo)
Medio agar con Xilosa-lisina-Desoxicolato	De color rojo, con o sin centros negros.
Medio agar Con sulfito de bismuto	De color negro o verde.

Si se encuentran colonias de bastones gram-negativos que se ajustan a la descripción de la tabla 4, proceder con una identificación adicional transfiriendo colonias sospechosas representativas individualmente, por medio de un asa de inoculación, a un tubo inclinado de medio Agar-Triple Azúcar-Hierro estriando primero la superficie inclinada y luego clavando el asa bien por debajo de la superficie. Incubar. Si en el examen no se hallan indicios de que los tubos presentan líneas oblicuas alcalinas (rojas) y extremos ácidos (amarillos), (con o sin un ennegrecimiento concomitante de los extremos por producción de sulfuro de hidrógeno), la muestra cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia del género *Salmonella*.⁽¹⁾

Prueba para determinar la ausencia de *Escherichia coli*: Con ayuda de un asa de inoculación, hacer estrías con una porción del medio líquido de lactosa restante sobre la superficie del medio agar de MacConkey. Cubrir las placas, invertirlas e incubar. Al examinar las placas, si ninguna de las colonias se ajusta a la descripción que aparece en la tabla 5 para este medio, la muestra cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *Escherichia coli*.⁽¹⁾

TABLA 5. Características morfológicas de la *Escherichia coli* en medio Agar de MacConkey.

Tinción Gram.	Morfologías características de las colonias.
Bastones negativos (cocos – Bacilos).	De color rojo ladrillo, pueden tener una zona de bilis precipitada alrededor.

Si se encuentran colonias que se ajustan en la descripción que aparece en la tabla 5, proceder con una identificación adicional transfiriendo las colonias sospechosas individualmente, por medio de un asa de inoculación, a la superficie de medio Agar de Levine con Eosina- Azul de Metileno colocadas en placas de Petri. Si debe transferirse un número grande de colonias, dividir la superficie de cada placa en cuadrantes y sembrar cada uno de ellos con una colonia diferente. Cubrir las placas, invertirlas e incubar. Al examinarlas, si ninguna de las colonias exhibe un brillo metálico característico bajo la luz reflejada y si ninguna de ellas presenta una apariencia negro azulada bajo la luz transmitida, la muestra cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *Escherichia coli*. La presencia de *Escherichia coli* se puede confirmar mediante otras pruebas adicionales bioquímicas y de cultivos adecuados, si fuera necesario.⁽¹⁾

Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras.

Proceder como se indica en el método en placas en recuento total de microorganismos aerobios, excepto que se debe utilizar la misma cantidad de medio Agar Dextrosa de Sabouraud o Medio Agar Papa Dextrosa, en lugar de

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

medios digeridos de Caseína- Soja y se deben incubar las placas de Petri invertida durante 5 a 7 días a una temperatura de 20 °C a 25 °C. ⁽¹⁾

Repetición de la Prueba.

A fin de confirmar un resultado dudoso mediante cualquiera de los procedimientos descritos en las pruebas anteriores después de su aplicación a una muestra de 10 g, puede realizarse una nueva prueba en una muestra de 25 g del producto. Proceder como se indica en procedimientos teniendo en cuenta que la muestra es más grande. ⁽¹⁾

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

4. DISEÑO METODOLOGICO

Tipo de Estudio: Cuasi Experimental.

Área de Estudio: Departamento de Control de Calidad de Drogas y Medicamentos; situado en el segundo piso del edificio de la Facultad de Ciencias Químicas (Campus Médico-UNAN León), área de microbiología.

Universo: Todos los jugos de Noni comercializados en la Ciudad de León.

Muestra: Diez jugos de Noni.

Unidad de Análisis: Jugo de Noni.

Tipo de Muestreo: Por Conveniencia.

Procedimiento para la Recolección de la Muestra: Se realizó una encuesta en todas las farmacias y/o centros naturistas de la ciudad de león para determinar el jugo de Noni que más demanda la población. Todas las muestras pertenecían al mismo lote.

Criterios de inclusión:

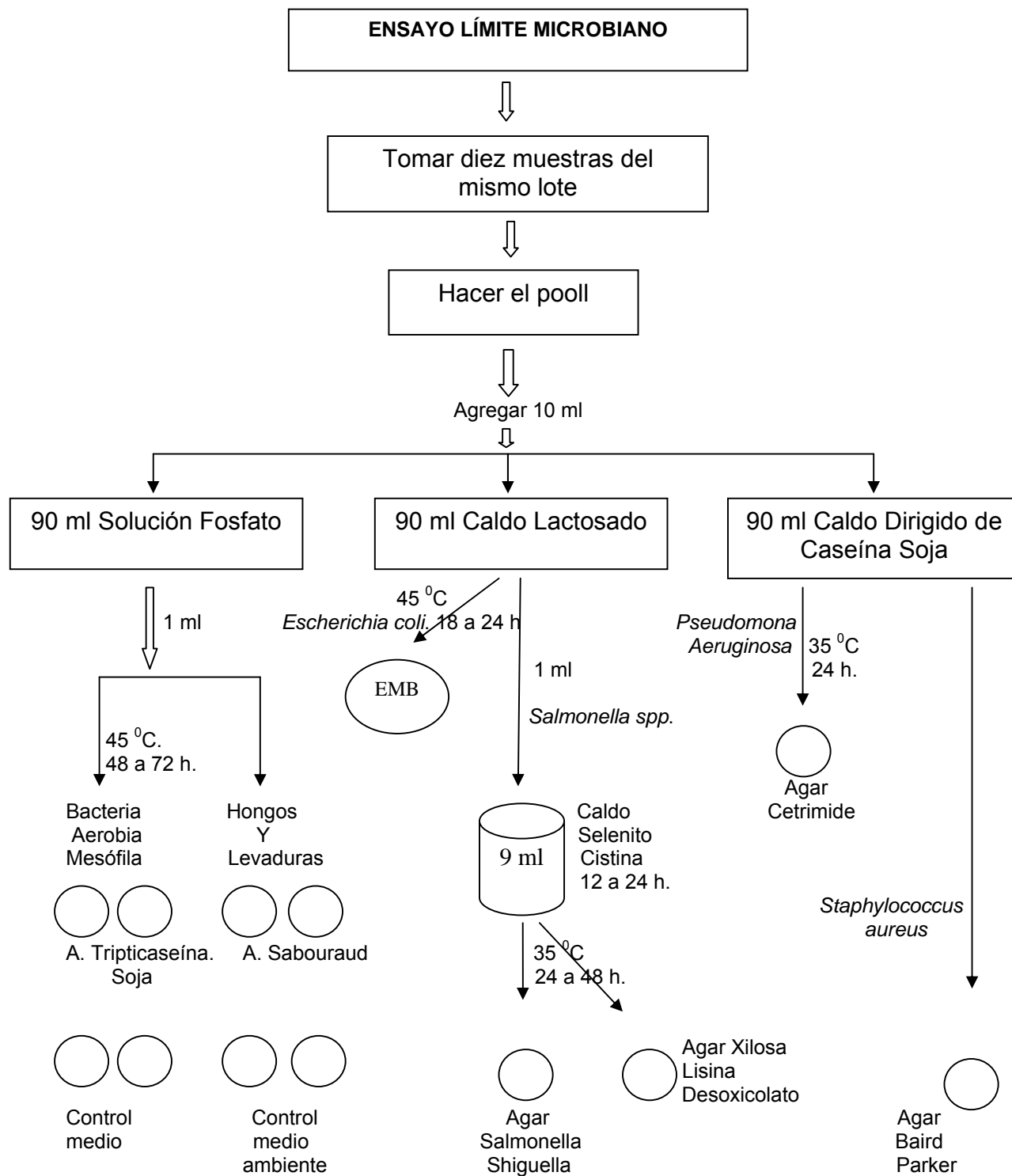
- Comercializado en la Ciudad de León.
- Marca más demandada por la población.
- Farmacias y Centros Naturistas.

Criterios de exclusión:

- Jugos comercializados en los diferentes mercados y por vendedores ambulatorios de la Ciudad de León.

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia L.* (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

PROCEDIMIENTO



EQUIPOS Y REACTIVOS

EQUIPOS:

- | | | |
|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| 1. Tubos de ensayos. | 6. Mechero Bunner. | 12. Autoclave. |
| 2. Erlenmeyer. | 7. Incubadoras. | 13. Esterilizador. |
| 3. Beaker 250 y 1000 ml. | 8. Láminas y cubre objetos. | 14. Balanzas. |
| 4. Platos Petri. | 9. Asas de platino. | 15. Espátulas. |
| 5. Pipetas 5 y 10 ml. | 10. Gradillas. | 16. Microscopio. |
| | 11. Cocina. | 17. Contador de colonia. |

REACTIVOS:

- | | |
|---------------------------------|--|
| 1. Fosfato monobásico potásico. | 7. Agar EMB (Eosina azul de metileno). |
| 2. Caldo lactosado. | 8. Agar Baird- Parker. |
| 3. Caldo tripticaseína soja. | 9. Agar XLD (Xilosa, lisina y desoxicolato). |
| 4. Agar tripticaseína soja. | 10. Caldo Selenito cistina. |
| 5. Agar sabouraud. | |
| 6. Agar cetrimide. | |

MATERIAL PARA ESTERILIZAR:

- | | |
|--------------------|----------------|
| 1. Algodón. | 5. Cloro puro. |
| 2. Papel aluminio. | 6. Guantes. |
| 3. Detergente. | 7. Alcohol. |
| 4. Jabón líquido. | |

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

5. RESULTADOS

Al realizar el estudio sobre la determinación del límite microbiano al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) se obtuvieron los siguientes resultados:

TIPO DE ANALISIS	RESULTADO DE ENSAYO	ESPECIFICACIONES
Límite Microbiológico		
Bacterias Aerobias Mesófilas	Menos de 10 UFC/ML*	No más de 100 UFC/ML
Staphylococcus aureus	Ausencia	Ausencia
Pseudomona aeruginosa	Ausencia	Ausencia
Escherichia coli	Ausencia	Ausencia
Salmonella spp	Ausencia	Ausencia
Recuento de Hongos y Levaduras	Ausencia	No más de 10 UFC/ML

*La farmacopea USP XXIX refiere que al haber ausencia de Bacterias Aerobias Mesófilas se reporte como menos de 10 UFC/ML.

6. ANALISIS DE RESULTADOS

En base a los resultados obtenidos del jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) tenemos que:

- ❖ Al utilizar el medio de cultivo Agar Tripticaseína Soja, posterior al período de incubación de 48 horas no obtuvimos crecimiento de colonias, evidenciando la ausencia de Bacterias Aerobias Mesófilas.
- ❖ En la identificación de Hongos y Levaduras, el medio utilizado fue Agar Dextrosa de Sabouraud, incubado por 3 días. No se evidenció crecimiento de colonias características.
- ❖ Para Bacterias Patógenas se utilizaron los medios de cultivo de Caldo Lactosado para *Escherichia coli* y *Salmonella spp* y el Caldo Digerido de Caseína Soja para *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. La aparición de turbidez en la muestra indica la presencia de organismos patógenos, debido a las características fisicoquímicas del jugo no es posible determinar claramente la presencia o no de turbidez por lo que se cultivó en medio selectivo respectivo.
- ❖ En el caso de *Escherichia coli* el medio selectivo empleado fue Eosina Azul de Metileno, la presencia de colonias verdes con brillo metálico integradas por bacilos Gram negativos indica la presencia probable de *Escherichia coli*. No se encontraron colonias características.
- ❖ El medio selectivo para *Salmonella spp* fue Agar Xilosa-Lisina Desoxicolato, la presencia de colonias rojas con o sin centro negro hace positiva la prueba. No se evidenció crecimiento de colonias características.
- ❖ Para *Pseudomona aeruginosa* se utilizó Agar Cetrimide, la presencia de colonias verdes azulosas, con luz ultravioleta se observan de color verdoso fluorescente, lo cual no fue evidente en este ensayo. Para el *Staphylococcus aureus* se utilizó el Agar Baird Parker, no encontrando colonias características (colonias negro brillante rodeadas de zonas claras de 2-5 mm de diámetro).

7. CONCLUSIONES

- El jugo de *Morinda citrifolia L.* (Noni) analizado en este estudio cumple con las especificaciones que establece la USP XXIX en relación al límite microbiano, por lo tanto no representa un problema de salud pública.

- En el presente estudio no se encontró la presencia de:
 - ❖ Bacterias Aerobias Mesófilas.

 - ❖ Bacterias Patógenas: *Escherichia coli*, *Pseudomona aureoginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*

 - ❖ Hongos y Levaduras.

- Se puede atribuir que el Laboratorio fabricante del fitofármaco analizado cumple con las Buenas Prácticas de Manufactura.

- Es presumible que el proceso de cultivo, recolección y almacenamiento fue el más adecuado.

8. RECOMENDACIONES

- ❖ Aunque el producto analizado cumple con las especificaciones microbiológicas de la USP XXIX es importante que el MINSA exija a estos fitofármacos comercializados el cumplimiento del análisis microbiológico debido a la alta demanda que estos tienen por la población.
- ❖ Hacer estudios posteriores sobre controles fisicoquímicos al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni).
- ❖ Realizar un estudio de límite microbiano a los jugos de *Morinda citrifolia* L. (Noni) comercializados en los diferentes mercados y a nivel ambulatorio de la Ciudad de León.
- ❖ Proponer al Ministerio de Salud (MINSA) una revisión de la etiqueta de estos fitofármacos para que alerte sobre la Hiperpotasemia por el consumo irracional.

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

9. BIBLIOGRAFIA

1. The United States Pharmacopeia 29 and The Nacional Formulary 24. Twenty-nine Edition. The United States Pharmacopeial Convention Inc. USA. 2006.
2. Gessner G. Hawley. Diccionario de química y de productos químicos. Editorial Ediciones Omega. S.A. Barcelona, 1985.
3. Cadena M, Soto M, Valladares F. Determinación de Características Físicoquímicas del Extracto Natural Pausterizado a Base de *Morinda citrifolia* L. Tesis de Grado. Facultad De Ciencias Químicas. Departamento de Análisis de Drogas y Medicamentos. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León, Abril 2005.
4. Arguello N, Martínez Y. Análisis Microbiológico de Fitofarmacos no obligatoriamente Estériles Elaborados por el Laboratorio ECOLIFE. Facultad De Ciencias Químicas. Departamento de Análisis de Drogas Y Medicamentos. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León, Marzo 2004.
5. Rueda J. Navarrete J. Determinación microbiológico de los diferentes tipos de té que se comercializa en los supermercados de León en el periodo septiembre-octubre de 1995. Tesis de Grado. Facultad De Ciencias Químicas. Departamento de Análisis de Drogas y Medicamentos. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León, Octubre 1995.
6. ¿Qué es el Noni? [en línea]. [fecha de acceso 13 de noviembre del 2006]; URL disponible en:
http://www.google.com/search?q=cache:T07cB7QyLAoJ:www.noni.com.pa/+noni&hl=es&gl=ni&ct=clnk&cd=11&lr=lang_es
7. Galdo Fernández Amelia. ¿Es el Noni una planta milagrosa? Salud Vida: Lo natural y tradicional. [en línea] 2006 Octubre 30 [fecha de acceso 13 de noviembre del 2006]; URL disponible en:
http://www.google.com/search?q=cache:0lsArpHhklsJ:www.sld.cu/saludvida/naturaltradicional/temas.php%3Fidv%3D10541+noni&hl=es&gl=ni&ct=clnk&cd=109&lr=lang_es
8. Gómez Mario. Noni. La farmacia natural de la Polinesia. Ecoaldea. [en línea] [fecha de acceso 15 de octubre del 2006]; URL disponible en:
http://www.google.com/search?q=cache:3kIExwJsHAWJ:www.ecoaldea.com/plmd/noni.htm+Noni,+la+farmacia+natural+de+la+polinesia&hl=es&gl=ni&ct=clnk&cd=1&lr=lang_es

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

9. Salmerón Núñez Luís. Noni con fama asegurada. La Prensa. [en línea] 2005 Mayo 4 [fecha de acceso 20 de Octubre del 2006]; URL disponible en: http://www.google.com/search?q=cache:GlaLDt-eCkJ:www.laprensa.com.ni/archivo/2005/mayo/04/campoyagro/+www.laprensa.com.ni/archivo/2005/mayo/04/campoyagro/&hl=es&gl=ni&ct=clnk&cd=1&lr=lang_es
10. Ruiz Molina Caroll. Morinda citrifolia. Monografías. [en línea] 2006 Octubre 23 [fecha de acceso 10 de noviembre del 2006]; URL disponible en: http://www.google.com/search?q=cache:e-sK09kja0QJ:www.monografias.com/trabajos38/el-noni/el-noni.shtml+Noni&hl=es&gl=ni&ct=clnk&cd=22&lr=lang_es
11. Alimentación Sana. [en línea] 2006 Octubre 09 [fecha de acceso 28 de noviembre del 2006]; URL disponible en: http://www.google.com/search?q=cache:YJw1nWetQZ4J:www.alimentacion=sana.com.ar/informaciones/Noni/noni.estudios.html+morinda+citrifolia&hl=es&gl=ni&ct=clnk&cd=11&lr=lang_es
12. Rodríguez Montoya Martha C. Los beneficios de la pasteurización del helado. Consuma seguridad. [en línea] 2004 Agosto 18 [fecha de acceso 28 de noviembre del 2006]; URL disponible en: <http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2004/08/18/13976.php>
13. Gonzáles Lavaut Nirda E., Gonzáles Lavaut José A. Morinda citrifolia Linn.: Potencialidades para su utilización en la salud humana. Revista Cubana de Farmacia. [en línea] 2003 Septiembre [fecha de acceso 25 de noviembre del 2006]; 37. URL disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152003000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
14. Ruiz Quiroz Julio Reynaldo. Control límite microbiano. El rincón del vago. [en línea] [fecha de acceso 29 de noviembre del 2006]; 6 pág. URL disponible en: <http://html.rincondelvago.com/control-de-limite-microbiano.html#>
15. Murguía Carol. Noni la planta sagrada. La Prensa. [en línea] 2003 Diciembre 4 [fecha de acceso 29 de Noviembre del 2006]; URL disponible en: <http://www.google.com/search?q=cache:xDxa56Z5lqcJ:www-ni.laprensa.com.ni/archivo/2003/diciembre/04/campoyagro/+noni&hl=es&gl=ni&ct=clnk&cd=2>

Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en Farmacias y/o Centros Naturistas de la Ciudad de León. Enero 2007.

ANEXOS

ENTREVISTA

La siguiente información será utilizada para fines del estudio, no se revelara el nombre de la farmacia y/o centro naturista consultados.

1. Nombre de la Farmacia y/o Centro Naturista.

2. ¿Comercializa el jugo de Noni?

Si: _____ **No:** _____

Si la respuesta es afirmativa se procede a responder las siguientes preguntas:

3. ¿Cuál es el de mayor demanda?

4. Precio al público.

5. ¿Tiene registro sanitario?

Si: _____ **No:** _____

GLOSARIO

Análisis del Medicamento:

Es el conjunto de inspecciones, pruebas y ensayos a los cuales se somete una muestra de un medicamento, con el fin de obtener información inequívoca acerca de su identidad, uniformidad, pureza, potencia o concentración además para denotar pruebas de identidad y otras como biodisponibilidad y estabilidad las cuales en un sentido estricto, no se consideran pruebas analíticas. El término "Análisis del Medicamento" se refiere al conjunto de determinaciones destinadas a examinar su calidad.

Buenas Prácticas de Laboratorio:

Conjunto de reglas, procedimientos operativos y prácticas adecuadas para garantizar la calidad e integridad de los datos generados por un laboratorio.

Buenas Prácticas de Manufactura:

Conjunto de procedimientos y normas destinadas a garantizar, en todo momento, la producción uniforme de lotes de medicamentos que satisfagan las normas de identidad, actividad, pureza, etc.

Control de Calidad:

Sistema planificado de actividades cuyo propósito es el de asegurar un producto de calidad, el cual incluye, todas las medidas requeridas para asegurar la producción de lotes uniformes de medicamentos que cumplan con las especificaciones establecidas de identidad, potencia, pureza y otras características.

Farmacopea:

Conjunto o colección de normas sobre principios activos, productos farmacéuticos auxiliares, productos medicamentosos o terminados y métodos recomendados a objeto de constatar si estos los cumplen y que ha sido publicado o reconocido por la autoridad sanitaria competente. Existen farmacopeas nacionales, plurinacionales, como la Farmacopea Europea, Farmacopea Internacional, Farmacopea de los Estados Unidos, ésta última tiene status legal en varios países de América Latina.