

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA  
UNAN – LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICA  
ESCUELA DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE ANALISIS DE DROGAS Y MEDICAMENTOS.**



**TEMA: ESTUDIO MICROBIOLÓGICO EN JARABE DE CARAO  
(CASSIA GRANDIS L.) CON MAYOR DEMANDA A NIVEL  
AMBULATORIO EN LA CIUDAD DE LEON.**

**FEBRERO 2008.**

**MONOGRAFIA PARA OPTAR AL TITULO DE LIC. QUIMICO –  
FARMACEUTICO.**

**AUTORES:**

**BR. YESSENIA ARBIZU RAMIREZ  
BR. MARIA JOSE BERRIOS ROMERO**

**TUTOR.**

**MSC. LISSETH ARAUZ**

**LEON, 2008.**



### **AGRADECIMIENTO:**

Este trabajo no hubiese sido posible sin la ayuda de:

- Dios nuestro Señor Jesucristo que es el único inspirador y dador de vida y sin el no podía ser posible este trabajo.
  
- A Nuestra Tutora Msc. Lisseth Arauz quien nos brindo su apoyo y nos transmitió sus valiosos conocimientos, los cuales nos sirvieron de pilar para realizar nuestra monografía.
  
- A cada uno de nuestros padres por darnos diariamente el coraje y la fortaleza de seguir adelante y terminar nuestros estudios.
  
- A todos los docentes que nos compartieron su sabiduría durante estos años en la Facultad de Ciencias Químicas que nos permitieron ser mejores profesionales.



### **DEDICATORIA:**

A Dios nuestro creador por habernos permitido empezar y concluir nuestros estudios Universitarios e iniciar otra etapa en nuestra vida.

A nuestros padres por sus valiosos consejos, su ayuda incondicional y sus esfuerzos que permitieron salir adelante y obtener nuestro título Universitario.

A nuestros Hermanos, tíos por darnos su Amor y Confianza que nos han brindado para salir a delante y lograr nuestras metas.



## INTRODUCCION:

Desde tiempos pasados las plantas medicinales ocuparon un lugar muy importante en la medicina que han servido como recursos valiosos para curar las distintas enfermedades por su uso potencial en el ámbito farmacéutico, es que son de gran importancia.

La riqueza de conocimientos acumulado durante milenios por la medicina se han convertido en la moderna disciplina de la etnofarmacología (Estudio de la medicina nativa). Así lo ha demostrado el carao que debido a sus propiedades curativas para tratar anemia, hemorragias e infección dermatomucosa; sin embargo a pesar de ser muy utilizado por la población únicamente se encontraron tres estudios realizados en Nicaragua:

- Mayorga Rodríguez, estudios bromatológico del carao (*Cassia grandis* L.) León, Nicaragua, UNAN 1971.
- Estudios sobre la cura de anemia en animales a través de la administración de carao realizado en la escuela internacional de agricultura y ganadería, Rivas, Nicaragua.
- Bolaños López, Determinación del límite microbiano al jarabe de carao (*cassia grandis* L.) con mayor demanda por la población, comercializado en centros naturistas de la ciudad de León, enero 2007.

Se decidió realizar el presente trabajo investigativo debido a que muchas personas ingieren productos naturales que se comercializaron libremente en las calles como es el caso del jarabe de carao el cual ha tenido una importante introducción en el Mercado Nicaragüense, teniendo como principal demandante la población infantil, pero sin embargo no se le realiza un control microbiológico adecuado, pudiendo representar un peligro a las personas que lo ingieren.



### **OBJETIVO GENERAL:**

- Realizar ensayo microbiológico en jarabe de carao (*cassia grandis* L.) con mayor demanda de comercialización a nivel ambulatorio en la ciudad de León.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

- Identificar la presencia de bacterias patogenias: *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Salmonella Spp* en jarabe de *cassia grandis* L.
- Determinar la cantidad de hongos y levaduras en jarabe de *cassia grandis* L.
- Cuantificar la presencia de bacterias aerobias mesofilas en jarabe de *cassia grandis* L.



## MARCO TEÓRICO

### DESCRIPCIÓN DEL CARAO.

Familia: Caesalpinaceae.

Nombre científico: *Cassia grandis* L.

Sinónimos: Carol, Caraol.

### APRENDAMOS A CONOCER EL CARAO.

El árbol de carao afortunadamente es muy bien conocido ya que posee muchas características anatómicas, distintivas y por los múltiples beneficios que ofrece a la sociedad. Los árboles pueden llegar a ser bastante grandes y corpulentos, y no son raros los que miden de 20 y hasta más metros de altura, característico por su copa amplia y en forma de cúpula o media esfera, lo cual es posible gracias a una gran cantidad de ramas, muy largas y en forma de arcos, todo un prodigio arquitectónico de la naturaleza. El tronco es perfectamente cilíndrico y uniforme, de corteza gruesa y lisa, de color gris claro, cubierto por las cicatrices horizontales que dejan las ramas que se han desprendido con anterioridad, éstas cicatrices van desapareciendo conforme el tronco se hace más grueso, es muy notable el color anaranjado fuerte que posee la corteza de su parte interna.

### LAS HOJAS.

Las hojas del carao son compuestas y alternas, perfectamente paripinnadas, con la apariencia como de una pluma, con 20 a 40 folíolos, siempre en un par y miden unos 50cm de largo. Poseen un eje central peloso, acanalado, con 3 a 20 pares de hojuelas de 3 a 6 cm de largo, redondeados u obtusos en el ápice y en la base, con el borde liso y el ápice está provisto de una cerda fina. Ambas caras están densamente cubiertas de pelillos finos. La cara superior es lisa mientras la inferior es pubescente de color orín.



Los árboles producen una abundante cantidad de hojas que forman un follaje denso y espeso, ideal para dar sombra en lugares muy asolados. Sin embargo el carao es una especie caducifolia, motivo por el cual se desprende de todas su hojas durante los meses más secos del año.<sup>3</sup>

Las hojas nuevas empiezan a aparecer cuando el árbol está en plena floración, conformando una increíble combinación de forma, textura y colores. Las hojas contienen antraquinonas (aloe-emodina, ácido crisofánico, fisción, reina), barakol, fiavonoides, leucoantocianinas y saponinas.

### **LAS FLORES DEL CARAO.**

Individualmente son pequeñas, de colores que van desde blanco, rosado y lila en un mismo árbol, cada flor está compuesta por 5 pétalos encorvados como conchas que forman una corola de forma más o menos esférica. Las flores nacen agrupadas en densos racimos de hasta 20 y más centímetros de largo, con 15 o más flores cada uno y a veces recubren toda copa del árbol, los cuales aparecen una vez que el árbol ha botado todas sus hojas.

### **LOS FRUTOS DEL CARAO.**

Conocidos como sandales probablemente son las características más notables de este magnífico árbol. Al igual que todos los árboles de la gran familia de las Fabaceas o Leguminosas, los frutos del carao son legumbres que en este caso alcanzan los 50 o más centímetros de largo y hasta 4cm o más de grosor.

Los sandales son muy grandes, casi cilíndricas y pesadas, de cascara gruesa y dura de color verde, tomándose claro cuando están tierno y negros al madurar, pueden permanecer hasta un año en la copa, es muy común que los frutos nuevos se mezclen en la copa con los del año anterior , los frutos no se abren sino que al madurar caen pesadamente al pie del árbol madre. Una vez en el suelo los sandales son rápidamente atacados por una especie de insectos coleóptero que devoran todo el interior.

En el fruto se han encontrado ácido cinámico, hierro, vitaminas y azúcares internamente, el fruto está dividido en una gran cantidad de celdas circulares separadas por una pared



leñosa. En el interior de cada celda encontramos una semilla inmersa en un líquido espeso y de color café, de un olor muy penetrante y sabor muy particular que recuerda un poco al chocolate. Esta sustancia se conoce como santal o miel de carao y diluida en agua o leche es utilizada para elaborar exquisitas bebidas frías o calientes.

### **LA SEMILLA.**

Las semillas miden un poco más de 1cm de largo, tienen forma de almendra, su cubierta o cáscara es muy dura, lisa y de color café rojizo, las semillas contienen flavonoides y polisacáridos.

#### **Propagación de la semilla:**

Como las semillas del Carao no se dispersan porque los frutos al caer no se abren y por lo tanto están destinadas a quedar en su interior, es muy probable que los frutos deben ser comidos por ciertos animales herbívoros silvestres, los cuales muelen el duro fruto con sus dientes, se tragan las semillas las cuales transportan en sus estómagos largas distancias y luego dejan caer al suelo con sus excrementos. Los ácidos estomacales de estos animales herbívoros no digieren completamente estas duras semillas sino que más bien suavizan su dura cobertura y estimulan su capacidad de germinación.

Ya en el suelo la semilla luego de haber pasado por este tratamiento digestivo: germinan vigorosamente utilizando como primer sustrato los excrementos húmedos del herbívoro antes de fijarse a la tierra, sin embargo a falta de herbívoros silvestres esta misma función la realizan eficientemente las vacas, caballos y ovejas.

1-Al secarse se raja y se tuerce muy fácilmente.

2-Es muy severamente atacada por los insectos barrenadores de la madera.

3-Es muy susceptibles a la podredumbre causada por los hongos de la humedad.

En muy pocos días los trozos y piezas aserradas de esta madera se deterioran por completo debido a la combinación de los 3 factores mencionados.





## **ECOLOGIA.**

Prefiere lugares húmedos, aunque también. prospera en sitios con estación seca absoluta de 5 a 6 meses. En áreas secas prefiere los márgenes de ríos, es parte de bosques semicaducifolios de tierras bajas y ecosistemas de riberas, también muy común en lugares de clima fresco.

## **NATURAL.**

Desde el sur de México a través de toda América Central y las Antillas hasta Brasil.

## **PLANTADA.**

Se ha plantado en Guatemala, Honduras y Costa Rica, en zonas de bosques húmedos con 6 meses secos, a una elevación de 40m sobre el nivel del mar.

## **RECOLECCIÓN.**

El mejor momento para la recolección en América Central de marzo a Abril. Las vainas se recolectan de los árboles cuando tienen un color marrón oscuro o negro. A continuación se secan al sol por 1-2 días (3-4 horas por días) y se golpean para liberar la semilla, la cual se separa manualmente de las vainas rotas. Se remojan en agua por 2-3 días para disolver la cubierta mucilaginosa, se lavan y se secan. Cada vaina contiene unas 55 semillas en promedios, y cada Kg. contiene de 1200-3000 semillas. La viabilidad de la semilla fresca varía de 60-90% y la mantienen de 6-12 meses a condiciones ambientales. Se pueden almacenar por hasta 5 años a 4°C y con un 5-6% de contenido en humedad. Minación a bolsas a los 2 meses, el tiempo .requerido en un vivero es de al menos 4 meses, cuando las plantas alcanzan una altura de 20-25cm apropiadas para & traslado a su lugar definitivo en el campo.

## **MANEJO.**

Cuando se usa como árbol de sombra puede necesitar podas regulares.

Cuando el árbol es joven tiene una gran capacidad de rebrote y si se corta produce varios ejes.



### **TURNO Y CRECIMIENTO.**

En un ensayo de 4 años mostró un crecimiento moderado, con una altura promedio de 5.9m. En un suelo franco arcilloso, Ph 6.5-7.2 y 2500 árboles los crecimientos medios anuales a los 3 años de edad fueron de 1.7cm en diámetro y de 2.0 m en altura, con una productividad de 10.8m, la supervivencia fue del 95%. La especie pierde las hojas por un breve período en la estación seca y las vuelve a reponer en poco tiempo.

### **BENEFICIOS DEL CARAO.**

- 1) La pulpa de las vainas es un alimento riquísimo. De esa pulpa se hace una miel, con leche, es una bebida rica que se llama “sandalada”. Por tener mucho hierro y vitaminas, la sandalada quita la anemia. Es buena para todos especialmente para los niños y para las mujeres embarazadas, razón que le atribuye a esta parte de la planta ser la más utilizada por la población.
  
- 2) Su amplia copa y follaje denso, ofrecen una excelente sombra y “obertura para la protección de los suelos en contra de la erosión ocasionada por el viento y la lluvia.
  
- 3) El árbol se puede reproducir por medio de postes vivos extraídos de ramas, para la construcción de las cercas vivas de muchas fincas. Sin embargo esta práctica no es muy común ya que otras especies de árboles como el madero negro y el poro gigante ofrecen mucho mejores cualidades para este fin, como crecimiento más rápido y mayor porcentaje de supervivencia.
  
- 4) La madera posee un alto poder calórico y tradicionalmente ha sido una muy importante fuente de leña para el uso doméstico.
  
- 5) Los grandes frutos son muy ricos en proteínas y son una importante fuente de alimento para la vida silvestre durante la estación seca. También son comidos ávidamente y enteros por caballos, vacas, cerdos, cabras y ovejas. Hemos observado que las gallinas se alimentan de pulpa fresca.



6) La pulpa líquida contenida en el interior de los frutos es utilizada como bebida y es un importante recurso nutritivo para los seres humanos. ¡ATENCIÓN ¡El consumo de esta pulpa sin embargo debe ser moderado ya que también posee reconocidas propiedades digestivas como un laxante eficaz.

7) La ceniza de la madera se emplea para hacer jabón aunque cada vez con menos frecuencia.

8) La pulpa azucarada color café que rodea a las semillas se usa como sustituto de chocolate.

9) La acción de la hoja con sal se bebe para males del tracto digestivo.

10) Lavados y masajes con las hojas molidas para la picazón en la piel.

#### OTROS USOS MEDICINALES ATRIBUIDOS AL CARAO.

1. La decocción de hojas, frutos y cortezas se usa por vía oral para hemorragia nasal, enfermedades del hígado, infección urinaria, resfríos y tos. Por vía tópica se aplica un ungüento de hojas para tratar afecciones dermatomucosas (herpes, llagas, tiña.) de la raíz se extrae un líquido antiséptico utilizado en las curas de heridas, la corteza es utilizada como cicatrizante.

2. A las hojas y frutos se les atribuye propiedades antianémicas, antimióticos, antisépticas, astringentes, depurativas, diuréticas, estimulantes, expectorantes, laxantes, mineralizantes, purgantes y sedantes. A la raíz se le atribuye propiedad purgante y tónica.

#### JARABES.

Son preparaciones acuosas, límpidas, y de elevada viscosidad, que contiene un azúcar, generalmente sacarosa, en concentración similar a la de saturación.

Si el agente edulcorante es la sacarosa, la densidad del jarabe es 1.313 a 1 5°C-20°C ; el punto de ebullición 105°C y el contenido en sacarosa 64- 65% (p/p) que corresponde a 2/3 de sacarosa y 1/3 de agua.



## ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

### Materia prima (período pre y post-cosecha).

Los productos fitoterapéuticos son obtenidos a partir de las plantas cultivadas o silvestres, por tal motivo las posibilidades de contaminación microbiana son altas. Un apropiado proceso de recolección, cultivo, cosecha, secado, corte y almacenamiento es esencial para garantizar la calidad de los mismos.

### Niveles microbianos.

Las recomendaciones sobre la calidad microbiológica de los fitomedicamentos se encuentran dadas en el texto sobre “calidad microbiológica de las preparaciones farmacéuticas” (Farmacopea Británica armonizada, apartado 5.1.4 categoría 4) la categoría 4 es para fitomedicamentos que contienen una o más drogas (a sea enteras, fragmentadas o en polvos) y se divide en dos categorías:

#### 1. Fitomedicamentos a los que se les añade agua hirviendo antes de su uso:

- a. Conteo total aerobio. No más de  $10^7$  bacterias aeróbicas y no más de  $10^5$  hongos/g o por ml (Apéndice X\VIB2 Farmacopea Británica).
- b. No más de  $10^2$  Escherichia coli/g o por ml, utilizando las diluciones apropiadas (Apéndice XVI B1, Farmacopea Británica).

#### 2. Fitomedicamentos a los que no se les agrega agua hirviendo antes de utilizarse:

- a. Canteo total de aerobios. No más de  $10^7$  bacterias aeróbicas no más de  $10^4$  hongos/g o por ml (Apéndice XVI B2, Farmacopea Británica).
- b. No más de  $10^3$  enterobacterias y otras gram negativas/g o por ml (Apéndice XVI B1, Farmacopea Británica).
- c. Ausencia de Escherichia coli (lg o lml) Apéndice XVI B1.
- d. Ausencia de Salmonella spp. (10g o 10ml) Apéndice XVI B1.6



## **LIMITE MICROBIANO.**

Es un conjunto de pruebas utilizadas para estimar el número de microorganismos aerobios viables presentes y para determinar la ausencia de especies microbianas designadas en artículos farmacéuticos de todo tipo, desde materias primas hasta productos finales. Pueden utilizarse otros métodos automatizados en lugar de las pruebas que se presentarán posteriormente, siempre y cuando se hayan validado debidamente, comprobando que sus resultados son equivalentes o superiores.

### **Recomendaciones generales:**

1.- Durante la preparación y la realización de las pruebas, deben tomarse las precauciones asépticas necesarias para la manipulación de las muestras.

2.- A menos que se indique algo diferente, cuando el procedimiento especifique simplemente incubar, mantener el envase en aire que esté termostáticamente controlado a una temperatura entre 30°C y 35°C, durante un período de 24 a 48 horas.

3.- El tiempo transcurrido desde la preparación de la primera dilución hasta su incorporación con el medio de cultivo no debe exceder de una hora.

4.- El término crecimiento se usa aquí con un sentido especial, es decir, para designar la presencia y supuesta proliferación de microorganismos viables.

**Pruebas preparatorias.**

La validez de los resultados de las pruebas que se describen dependen en gran medida de que pueda demostrarse de manera adecuada.

### **Pruebas preparatorias**

La validez de los resultados de las pruebas que se describen dependen en gran medida de que pueda demostrarse de manera adecuada que muestras a las que se aplican no inhiben, por sí solas, la multiplicación, bajo las condiciones de la prueba, de los microorganismos que pudieran estar presentes. En consecuencia, antes de realizar una prueba de manera periódica según las circunstancias lo exijan posteriormente, las muestras diluidas del material que se desea analizar se deben inocular con cultivos viables de *Staphylococcus*



*aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella spp* separados. Esto se puede lograr agregando 1 ml de una dilución de no menos de 10<sup>-3</sup> de un caldo de cultivo de 24 horas del microorganismo a la primera dilución (en solución amortiguadora de Fosfato de Ph 7.2, Medio Líquido de Caseína-Soja, o Medio Líquido de Lactosa) del material de prueba y siguiendo el procedimiento de prueba. Si el o los microorganismos no crecen en el medio utilizado, queda invalidada esa parte del análisis y debe modificarse el procedimiento ya sea por:

- 1) Mediante un aumento en el volumen de diluyente, manteniendo la misma cantidad de material de prueba.
- 2) Mediante la incorporación de una cantidad suficiente de agentes inactivantes adecuados en los diluyentes.
- 3) Mediante una combinación apropiada de las modificaciones indicadas en 1 y 2 para permitir el crecimiento de los inóculos.

Los siguientes son ejemplos de ingredientes que pueden agregarse al medio de cultivo, y de las concentraciones respectivas para neutralizar las sustancias inhibidoras presentes en la muestra:

Ingrediente	concentración
lecitina en Soja	0.5%
polisorbato 20	4.0%

Como alternativa, se puede repetir la prueba según fue descrito anteriormente, utilizando Medio Líquido de Digerido de Caseína-Lecitina de Soja- Polisorbato 20 para demostrar la neutralización de los conservantes y otros agentes antimicrobianos presentes en el material de prueba. En aquellos casos en que el producto contenga sustancias inhibidoras y sea soluble, puede utilizarse una adaptación validada, adecuada, de uno de los procedimientos que se describen en el apartado Filtración por membrana en prueba de esterilidad del producto a examinar en pruebas de esterilidad (71).

Si a pesar de la incorporación de agentes inactivantes apropiados y de aumento sustancial del volumen de diluyente, aún no es posible recuperar los cultivos viables descritos anteriormente y si no es posible utilizar el método de filtración por membrana con ese artículo, puede suponerse que



la imposibilidad de aislar el microorganismo inoculado es atribuible a la actividad bactericida del producto: Esta información permite deducir que no es probable que el artículo se contamine con esa determinada especie de microorganismo. Deberá realizarse un seguimiento continuo para determinar el espectro de inhibición y la actividad bactericida del artículo.

### **MUESTREO.**

Proporcionar muestras de 10 ml o 10 gramos para cada una de las pruebas requeridas en la monografía correspondiente.

### **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 los 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 *Pseudomona aeruginosa* y Prueba para determinar la ausencia de *Salmonella spp* y *Escherichia coli*.

En el caso de muestras líquidas que consiste 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 *Pseudomona 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



( por ejemplo, uno de los polisorbatos), 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 *Pseudonoma 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 10,0 gramos o 10.0 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 fueran dudosos, repetir la prueba con una muestra de 20 envases más.

### **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 10,0 gramos 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 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 inhibidoras (antimicrobianas) según se describen en Prueba Preparatorias antes de determinar el Recuento Total de Microorganismos Aerobios. Agregar la muestra al medio a más tardar una hora después de preparar las diluciones apropiadas para inoculación.





### **Método 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 cajas 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 inclinado 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 a una temperatura de 35° C +1- 2°C.

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 de número de microorganismos por gramo o por ml de 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 gramo o por ml de la muestra.

### **Método en Tubo Múltiples.**

En cada uno de los 14 tubos de ensayos de tamaño similar, colocar 9.0 ml de Medio Líquido de Digerido de Caseína Soja. Distribuir doce de los tubos en cuatro grupos de tres tubos cada uno. Separar un grupo de tres tubos para utilizarlo como control. Pipetear 1ml 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 1ml del tubo A y transferir al tubo restante (B), no incluido en un grupo, y mezclar. Estos dos tubos contienen 100 mg (o 100 uL) y 10 mg (o 10 uL) de la muestra, respectivamente. Pipetear 1 ml del tubo A y transferir a cada uno de los tres tubos de segundo grupo (“10”) y pipetear 1ml 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 periodo 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 mas probable de microorganismos por gramos o por mililitros de muestra.



**Pruebas para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas 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- Jonson ( o Medio Agar de Baird-Parker o Medio Manitol-Agar Salado) y del Medio Agar Cetrimida, cada uno de ellos colocado en placas Petri. Cubrir las placas, invertirlas e incubar.

Si al examinarlas, ninguna de las placas contiene colonias con las características enumeradas en las tablas 2 y 3 para los medios utilizados, la muestra de prueba cumple con los requisitos de ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.

**Prueba de Coagulasa (para *Staphylococcus aureus*,).**

Con la ayuda de un asa de inoculación, transferir colonias sospechosas representativas desde la superficie de agar del Medio Agar de 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 3 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*.

**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 Fluorescencia y del medio *Pseudomonas* agar para la detección de Píocianina contenidas en las placas 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 +1- 2°C durante no menos de 3 días. Examinar las superficies estriadas bajo luz UV. Examinar las placas para determinar si hay colonias presentes con las características enumeradas en la tabla 2.

Por medio de la prueba de oxidasa, confirmar si un crecimiento de colonias sospechosas en uno o más medios corresponde a *Pseudomonas 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 de 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 *Pseudomonas aeruginosa*. La presencia de *Pseudomonas aeruginosa* se puede confirmar mediante otras pruebas bioquímicas y de cultivos adecuadas, si fuera necesario.

#### **Prueba para determinar la ausencia de *Salmonella spp* y *Escherichia coli*.**

Agregar 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 e Selenito

—Cistina y de Medio Líquido de Tetrationato, mezclar e incubar durante 12 a 24 horas (conservar el remanente del Medio Líquido de Lactosa).

#### **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 Tetrationato sobre la superficie del Medio Agar Verde Brillante, del Medio Agar con Xosa-Lisina-Desoxicolato y de Medio Agar con Sulfito de Bismuto contenidos 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 3, la muestra cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia del género *Salmonella*.



Si se encuentran colonias de bastones gram negativos que se ajustan a las descripciones de la tabla 3, proceder con una identificación adicional transfiriendo colonias sospechosas representativas individualmente, por medio de un alambre de inoculación, un tubo inclinado de Medio Agar — Triple Azúcar-Hierro estriando primero la superficie inclinada y luego clavando el alambre 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 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.

### **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 4 para este medio, la muestra cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de Escherichia coli.

Si se encuentran colonias que se ajustan a la descripción que aparece en la tabla 4, 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 colocados 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 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 adecuadas, si fuera necesario.



### **Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras.**

Proceder como se indica en el Método en Placa, en Recuento Total de Microorganismo Aerobio, excepto que se debe utilizar la misma cantidad de Medio Agar Dextrosa de Sabouraud o Medio Agar Papa Dextrosa, en lugar de Medio de Digerido de Caseína-Soja y se deben incubar las placas de Petri invertidas durante 5 a 7 días a una temperatura de 20°C a 25°C.

#### **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 10,0 gramos, puede realizarse una nueva prueba en una muestra de 25 gramos de producto. Proceder como se indica en Procedimiento teniendo en cuenta que la muestra es más grande.



## Material y método

### ➤ **Diseño metodológico.**

**Tipo de estudio:** El presente estudio es de tipo corte transversal, experimental.

**Area de estudio:** Departamento de analisis de drogas y medicamentos, area de microbiologia ubicado en el segundo piso de la facultad de ciencias quimicas, campus medico UNAN-LEON.

**Universo:** Jarabe de carao comercializados ambulatoriamente en la ciudad de leon.

**Muestra:** Cuatro frascos de jarabe de carao (muestra 1y 2).

**Unidad de analisis:** Jarabe de carao.

**Tipo de muestreo:** No probabilistico y de aceptación, debido a que permite establecer criterios para seleccionar la muestra, asi como lo que nos planteamos y exponemos posteriormente en el estudio.

### **Procedimiento de recolección de la muestra:**

Mediante una entrevista realizada a los vendedores ambulantes de la ciudad de león nos informamos cual era el jarabe de carao mas demandado por la población, procediendo a comprar 4 frascos de jarabe que corresponden a 2 muestras de diferente casa comercial para posteriormente realizar el ensayo.

### **Criterios de inclusión:**

- Jarabe de carao más utilizado por la población.
- Jarabe de carao sin registro sanitario.
- Jarabe de carao comercializado ambulatoriamente.

### **Criterios de exclusión:**

- Jarabe de carao comercializado fuera de la ciudad de león.
- Jarabe de carao menos utilizado por la población.
- Jarabe de carao que se comercializan en farmacias y centros naturistas de la ciudad de león.



## Material y equipo

Para el desarrollo de la parte experimental se utilizó el siguiente equipo de laboratorio:

- Cristalería (tubos de ensayo, Erlen Meyer, placas petri)
- Cocina, horno plato, marca CORNING. PC-100.
- Balanza triple brazo marca OHAUS.
- Incubadora doble, marca PRECISION, temperatura 37 °C
- Autoclave, marca VERNITRON regencia (via húmeda)
- pHmetro, marca CORNING, modelo 10.
- Horno, marca PRECISION
- Mechero BUSNER.

### Equipo metálico:

- Asa de henle
- Espátula
- Gradillas metálicas

### Material de laboratorio descartable:

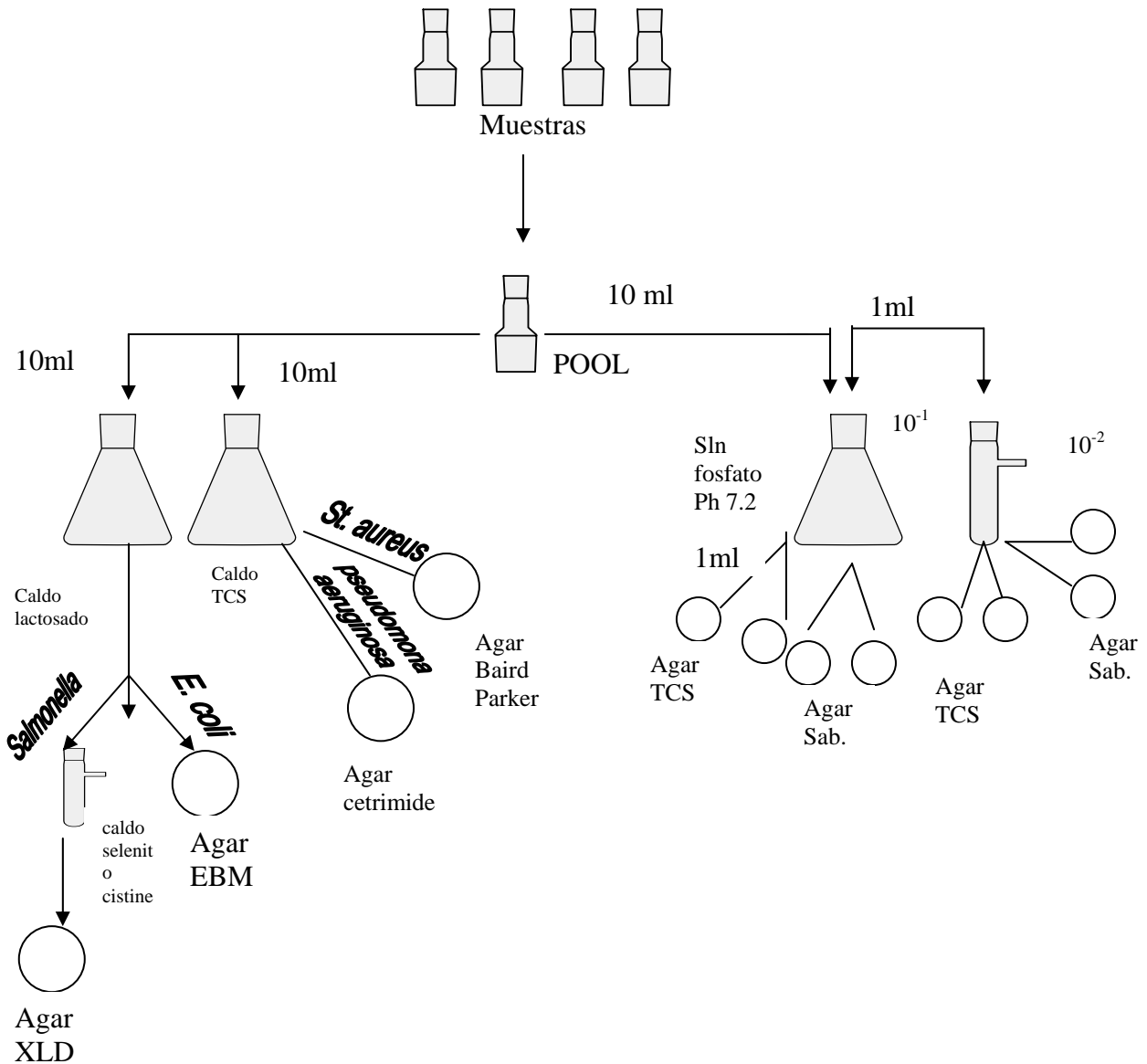
- Algodón
- Papel de aluminio
- Guantes estériles
- Boquillas
- Zapatos quirúrgicos
- Gorros quirúrgicos

### Reactivos:

- Trypticaseína- Soja Agar.
- Selenito- Cisterna.
- Sabouraud Agar.
- Caldo Trypticaseína Soja.
- Agar EMB.
- Caldo Lactosado.
- Agar Baird parker.
- Agar Cetrimide.
- Agar Salmonella- Shiguella.
- Fosfato Monobásico.



**PROCEDIMIENTO DEL ANALISIS MICROBIOLÓGICO REALIZADO EN LAS MUESTRAS DE JARABE DE CARAO.**



❖ SE REPITE EL MISMO PROCEDIMIENTO PARA LA MUESTRA DOS.

- Agar TCS: agar tripticaseina soja.
- Agar Sab.: agar sabouraud
- Agar XLD: agar xilosa-lisina-desoxicolato.
- CDS: caldo digerido de caseina soja.
- EMB: eosina azul de metileno





## Resultados

Al llevar a cabo el límite microbiano bajo las condiciones experimentales necesarias a las dos muestras de jarabe de carao ( *cassia grandis L* ) con mayor demanda por la población el cual es comercializado ambulatoriamente en la ciudad de León, se obtuvieron los siguientes resultados.

### Muestra 1

Tipo de análisis Límite microbiano	Resultados del ensayo	Especificaciones de la OPS
Bacterias Aerobias Mesofilas (BAM)	30000 UFC /ml	No más de 10 <sup>5</sup> UFC /ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Ausencia
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausencia	Ausencia
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausencia
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia	Ausencia
Recuento de hongos y levaduras	30000 UFC/ ml	No más de 10 <sup>4</sup> UFC /ml

### Muestra 2

Tipo de análisis Límite microbiano	Resultados del ensayo	Especificaciones de la OPS
Bacterias Aerobias Mesofilas (BAM)	490 UFC /ml	No más de 10 <sup>5</sup> UFC/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Ausencia
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausencia	Ausencia
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausencia
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia	Ausencia
Recuento de hongos y levaduras	1040 UFC /ml	No más de 10 <sup>4</sup> UFC /ml

### Muestra 1

- La presencia de las bacterias aerobias mesófilas fue mayor de 30000UFC/ ml de la muestra.
- Al utilizar los medios selectivos para la detección de bacterias patógenas: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Estaphylococcus aureus* y *Salmonella spp* la muestra no presentó ningún crecimiento.
- Al finalizar el período de incubación de hongos y levaduras se obtuvieron 30000 UFC /ml de la muestra.

### Muestra 2

- La presencia de las bacterias aerobias mesofilas fue de 490 UFC/ ml de la muestra.
- Al utilizar los medios selectivos para la detección de bacterias patógenas: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Estaphylococcus aureus* y *Salmonella spp* la muestra no presentó ningún crecimiento.
- Al finalizar el período de incubación de hongos y levaduras se obtuvieron 1040 UFC/ml de la muestra.



## DISCUSION

Una vez terminado el periodo de incubación de las muestras 1 y 2 en el caldo lactosado y en el caldo digerido de caseína- soja, no se podía observar en los caldos la presencia o no de turbidez, precipitación o floculación, esto debido a las características físico- químicas del producto (coloración, viscosidad y consistencia) razón por la cual se procedió a inocular en medios selectivos: el medio selectivo Baird Parker presentó ausencia de colonias características (colonias negras brillantes rodeadas por zonas claras de 2-5mm) lo que comprueba la ausencia de *Staphylococcus aureus*, en el Agar EMB no se observó colonias características (colonias bacilares color rojo ladrillo) de *Escherichia coli* de igual forma se observó en el Agar cetrimide para *Pseudomonas aeruginosa* (colonias generalmente verde) y en el Agar SS para *Salmonella* y *Shigella*.

Luego de transferir 1 ml de la solución amortiguadora de fosfato por duplicado a las placas petri y realizar el control ambiental y esteril del medio, se procedió a agregar los medios Agar Trypticaseína-soja y Agar sobouraud a las correspondientes placas homogenizando con suaves movimientos en forma de ocho, luego de solidificado el medio se incubó, 48 horas después se encontró la presencia de colonias de bacterias Aerobias Mesofilas en el Agar Trypticaseína- soja y presencia de hongos y levaduras en el Agar Sabouraud después de 72 horas de incubación, procediendo a cuantificar el número de colonias encontradas en los medios de cultivos correspondientes.

Encontrándose en la Muestra 1 gran cantidad de colonias por lo cual no se pudo contar con exactitud, llevándonos a repetir el ensayo para Bacterias Aerobias Mesofilas y hongos y levaduras haciendo más diluciones donde los resultados fueron más precisos, lo que hace suponer que en la elaboración no se cumple con las buenas prácticas de manufactura.

De acuerdo con los resultados obtenidos para la muestra 1 se asume que esta no cumple con las buenas prácticas de manufactura durante su elaboración, suponiendo que no está apta para consumo de la población, por su gran cantidad de Bacterias Aerobias Mesofilas y levaduras, en cambio en la muestra 2 se observó la presencia de estas pero dentro del rango establecido por las especificaciones de la OPS.

Se presume que el lugar de fabricación de muestra 2 cumple con las buenas prácticas de manufactura, en cambio la muestra 1 carece de estas.



## CONCLUSION

Al haber concluido la realización del ensayo del límite microbiano a las muestras correspondientes 1 y 2 de jarabe de carao (*Cassia grandis* L.) nos permitió emitir las siguientes conclusiones:

- Que en las muestras analizadas se encontró la presencia de bacterias aerobias mesófilas, donde la muestra uno no cumple con el rango establecido por la OPS a diferencia de la muestra dos donde las colonias encontradas estaban dentro del rango.
- En el caso de bacterias patógenas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp*) hay ausencia de estos microorganismos en ambas muestras.
- En los fitofármacos analizados en este ensayo se encontró presencia de hongos y levaduras, de la cual la muestra uno no cumple con la especificación establecida y la muestra dos si cumple con las especificaciones.

Por tanto de las muestras analizadas de jarabe de carao (*Cassia grandis* L.) la muestra 2 cumple con las especificaciones de la OPS, mientras que la muestra 1 no las cumple



## **RECOMENDACIONES**

Que las autoridades facultativas pongan a disposición los resultados del estudio realizado al Ministerio de Salud como ente regulador de control de calidad de todos los medicamentos.

Al MINSA que exija y compruebe la existencia de registro sanitario, fecha de vencimiento, número de lote, fecha de elaboración, contraindicaciones, indicaciones de todos aquellos fitofarmacos comercializados ambulatoriamente y que garantice el retiro del mercado de todos aquellos fitofarmacos que se encuentren vencidos.

Realizar este tipo de ensayo a otros fitofarmacos que no presenten un registro sanitario para comprobar su calidad.



## BIBLIOGRAFIA

- Solis N. Pablo Guerrero de Solis. Nilka, GattusoSusana, Caceres Armando. Manual de caracterizacion y analisis de drogas vegetales y productos fitoterapeuticos. Organización de los Estados Unidos Americanos. Paginas 84-93.
- Bolaños López, Determinación del límite microbiano al jarabe de carao (cassia grandis L.) con mayor demanda por la población, comercializado en centros naturistas de la ciudad de León, enero 2007.
- [www.acguanacaste.ac.cr/paginasespecies/plantaeonline/magnoliophyta/fabaceae/cassia\\_grandis/c-grandis12jun1998.html](http://www.acguanacaste.ac.cr/paginasespecies/plantaeonline/magnoliophyta/fabaceae/cassia_grandis/c-grandis12jun1998.html).
- Mayorga Rodriguez, Ibas. Estudio bromatologico del carao( cassia grandisL.). Leon, Nicaragua. UNAN 1971.



# ANEXOS

---

---

## ENTREVISTA

La presente fue llevada a cabo con el objetivo de conocer que tipo de jarabe de carao es el mas comercializado ambulatoriamente en la ciudad de león en el mes de febrero 2008.



1. ¿Cuántos tipos de jarabe de carao acostumbra vender?
2. ¿Cuál de los tipos de jarabe de carao tiene mas demanda por la población?
3. ¿Cuáles son los precios de los diferentes tipos de jarabe de carao que anda vendiendo?

---

---

**Planta entera**

Árbol de 12 a 17 metros de altura y 60 cm de diámetro.



**Corteza y madera.**

De color gris y textura áspera.

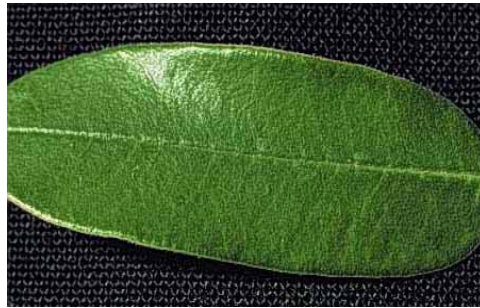


---

**Hojas:**

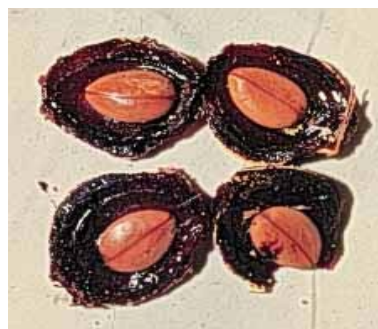
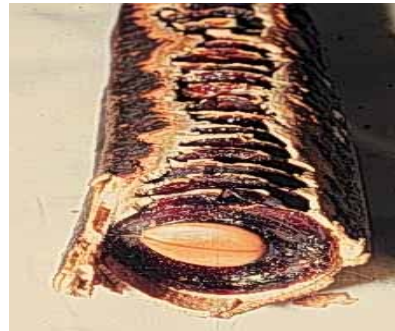
Paripinnadas, alternas de 18 a 30 hojuelas de forma ovalada y margen entero. El revés es tomentoso.





**Fruto:**

Una legumbre muy grande ( 55-65 cm de largo) color café oscuro, indehiscente. Tiene una sustancia melosa color café oscuro por dentro del fruto que es dulce y un poco astringente.



---

---

**Flor:**



Las inflorescencias son racimos terminales y axilares de flor rosada a lo largo de toda la rama tiene un aroma dulce y florece en marzo.

