

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEON



FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
CARRERA DE FARMACIA

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIADOS QUIMICOS FARMACEUTICO

AUTORES:

Br. MERCEDES DEL SOCORRO CANTILLO VILCHEZ

Br. MARIA JOSE ESQUIVEL BERRIOS

Br. DAREYSI YARETH FLORES FLORES

TUTOR:

LIC. KELVIN NUÑEZ

22 de ABRIL de 2009



Agradecimiento.

A Dios por guiarnos e iluminarnos en el arduo caminar y a la virgen María por ser madre y acompañarnos en las adversidades de nuestra vida.

A nuestros padres y familiares por darnos palabras de aliento cuando lo necesitábamos y por su apoyo incondicional sin esperar nada a cambio más que vernos realizadas y felices.

A nuestro tutor licenciado Kelvin Núñez porque siempre estuvo con nosotras ayudándonos a que esto fuese posible y porque siempre fue un profesor excepcional y servicial además de ser un buen amigo.

A nuestros profesores por haber compartido a través de la enseñanza todos sus conocimientos para hacer de nosotros buenos profesionales y mejores seres humanos.

A nuestros amigos que siempre estuvieron con nosotras en los buenos y malos momentos compartiendo nuestros logros y tristezas.

Gracias!



Dedicatoria

A Dios la razón de mi vida y fuente de toda sabiduría, a la virgen santísima por ser mi gran intercesora ante dios y porque ambos han sido mis amigos más fieles que nunca se han apartado de mi, permitiéndome lograr este gran triunfo.

A mis padres por haberme dado la vida, un hogar lleno de amor y por haberme enseñado el buen camino, pero muy en especial a mi madre por su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos, por tener siempre un consejo y palabras de aliento.

A mis hermanos por estar siempre pendiente de mí, brindándome todo su cariño, consejos, buenos deseos y apoyarme económicamente.

A mi prima que ha sido más que eso, una gran hermana y amiga, por haber contribuido de gran manera a mi formación tanto emocional como económicamente.

A mi novio por darme siempre innumerables muestras de su amistad, amor, comprensión y confianza, por su apoyo y palabras de aliento para seguir adelante aun en medio de las dificultades.

Mercedes de socorro cantillo Vílchez.



Dedicatoria:

Al terminar una etapa más de mi vida, con la realización de esta monografía siendo fiel a mis principios cristianos se la dedico en primer lugar a Dios, principio y fin de mi existencia a Jesucristo su Único hijo que a través de la iglesia me ha sabido guiar por la enseñanza del amor a los demás; a la Virgen María mi madre que ha sido una estrella en las noches de mi vida.

También quiero dedicarla a personas que me han indicado el camino de la verdad, en primer lugar a mi familia que entre sus luces y sombras he recibido la formación básica que me ha servido para enfrentar las adversidades de este mundo, a mi madre Rosa Clelia Berrios Midence que ha sido un pilar fundamental en mi vida y de manera muy especial se la dedico a Tomas Sergio A. Zamora Calderón, la persona que desde el primer momento que entro en mi vida no ha dejado ni dejara de acompañarme en mi vivir de cada día.

María José Esquivel Berrios.



Dedicatoria.

A Dios por haberme guiado siempre por el camino correcto y estar acompañándome en todo momento durante toda la travesía que han sido mis estudios y sin el toda mi vida no hubiese sido posible.

A una persona tan importante en mi vida por lo cual le doy la gracias a Dios por habérmela dado, a mi mamá Mercedes Flores. Ya que ella ha dedicado toda su vida a mí, para que yo pudiese llegar hasta aquí, y aunque en este momento no estamos juntas, siempre se ha encargado de que no me falte nada tanto económicamente como emocionalmente. Ella ha sido la persona fundamental en toda mi formación tanto profesional como moral. Por todo esto y mucho más te amo mama este logro en mi vida es tuyo.

Dareysi Yareth Flores Flores.



INDICE

CONTENIDO:

I. Tema.....	2
II. Introducción.....	3
III. Objetivos.....	4
IV. Marco Teórico.....	5
V. Hipótesis.....	25
VI. Diseño Metodológico.....	25
Material y Equipo.....	26
Procedimiento.....	27
Esquematización de procedimiento en la inoculación de los jarabes.....	34
VII. Resultados.....	35
VIII. Análisis de resultados.....	35
IX. Conclusión.....	39
X. Recomendaciones.....	40
XI. Bibliografía.....	41
XII. Anexos.....	42



TEMA:

Concentración in vitro de un agente conservador natural en un fitoterápico de carao, realizado en el periodo de febrero-abril 2009.



INTRODUCCION

Las plantas medicinales son utilizadas desde tiempos remotos como el recurso mas importante para solucionar los problemas de salud de los pueblos. La OMS define como fitofármaco al producto obtenido por procesos tecnológicamente adecuados, empleando exclusivamente materias primas vegetales. En nuestro país el Ministerio de salud, a través del decreto supremo 1876/1995, artículo 26, letra h) define: “Los fitofármacos o medicamentos herbarios son productos terminados y etiquetados, cuyos principios activos son exclusivamente drogas vegetales o preparaciones vegetales. El presente trabajo tiene como finalidad establecer la correlación entre un estudio in vitro realizado a un producto natural al cual se le atribuyen propiedades conservadoras a concentración de 1000 µg/ml la cual puede verse disminuida o afectada por la presencia de otros compuestos presentes comúnmente en productos fitoterápico, como son tinturas, las cuales suelen ser hidroalcohólicas para lo cual se remarca la importancia del presente estudio siendo que se busca establecer si en concentración de 1000 µg/ml el producto aun es efectivo. Actualmente el mercado nacional esta en vía de armonización a nivel centroamericano con la apertura del CAFTA y otros niveles de comercialización de producto. Para lo cual los productos naturales medicinales a los que se les adicionen sustancias de síntesis química o aislada de material natural no serán considerados como productos naturales medicinales. Por lo cual los parabenos han sido tradicionalmente los conservadores mas ampliamente utilizados tanto en medicamentos naturales como de síntesis. La gran utilización de las plantas medicinales, los avances de la tecnología y las técnicas modernas de análisis han transformado su estudio, desarrollo y producción, en un verdadero desafío para los centros de investigación (universidades, centros privados) y para la industria farmacéutica en la obtención de productos de calidad uniformes, eficaces y seguros, para el caso de los productos naturales el presente trabajo busca valorar la capacidad de inhibición de un conservador natural en un producto elaborado teniendo como referencia estudios anteriores de actividad in vitro para lo cual se permitiría proponerlo como conservador sustituyendo parabenos para productos naturales y permitir la oportunidad de competir con productos del mercado para su comercialización.



OBJETIVO GENERAL

- Determinar si en concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ el conservador natural inhibe el crecimiento de cepas seleccionadas de microorganismos gram positivos y gram negativos para un producto terminado fitoterápico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar la capacidad de inhibición de un conservador natural de estudios in vitro con un producto natural terminado.
- Comparar la respuesta de los microorganismos ensayados versus un conservador sintético.



Marco Teórico



MARCO TEORICO

CONSERVADORES

En los últimos años se ha manifestado una seria preocupación por parte de productores, investigadores y legisladores, debido a los riesgos y peligros potenciales derivados de la contaminación microbiológica de preparados farmacéuticos y de productos cosméticos e higiene. Los riesgos y peligros se consideran desde los puntos de vista:

- En primer lugar, en cuanto atañe al consumidor del producto, cuya salud pueda afectarse, y
- En segundo lugar, en lo que se refiere a la estabilidad del preparado, que puede verse comprometida si la calidad y la cantidad de gérmenes se halla por encima de la tolerancia. En este caso, la contaminación puede llegar a ocasionar cambios definitivos, irreversibles en las características del producto, con el siguiente perjuicio económico.

El farmacéutico a cuyo cargo se encuentra el diseño y formulación de un producto debe procurar:

1. Que el mismo resulte adecuadamente preservado;
2. Que el sistema de preparación sea estable a lo largo de toda la vida útil del producto, desde su fabricación hasta su consumo;
3. Que se fabrique y controle con el nivel de higiene requerido
4. Que el envase sea adecuado para mantener su integridad microbiológica durante la vida útil.

La preservación microbiológica es un concepto que va mucho mas allá de una simple acción de conservadores a las formulas. Además de los requerimientos ya citados existen en el área farmacéutica, en la farmacia o en la fabrica, factores que pueden influir en la integridad primaria de la formula.

Estos factores se vinculan al modo como se haga la selección y almacenamiento de las materias primas, la fabricación y empaque y del producto y el funcionamiento del producto



terminado, los que deben cumplirse de modo tal que eliminen la posibilidad de una contaminación significativa en cualquiera de las etapas.

El análisis microbiológico de las materias primas y del producto terminado es indispensable en el control de calidad para asegurar que los productos sean idénticos de partida a partida y que no haya variación importante en cuanto a estabilidad,

EFICACIA ANTIMICROBIANA DE LOS CONSERVADORES.

Las preparaciones farmacéuticas o cosméticas se presentan en general como no estériles. Sin embargo, no deben presentar ningún peligro para el paciente, ni riesgo de modificación de la calidad de la preparación, en las condiciones normales de conservación y de empleo. Es entonces necesario, en el control de rutina, determinar la flora bacteriana o fúngica presente en esos productos después de la preparación. Pero ese control no es interpretable y no puede garantizar la calidad más que la medida en que se hayan probado la eficacia de los productos químicos de conservación o las propiedades antimicrobianas de la preparación farmacéutica misma. Es la razón por la que la mayoría de las farmacopeas proponen una monografía con el método de referencia que se debe aplicar para determinar la eficacia antimicrobiana de los agentes de conservación. Esta determinación es igualmente necesaria para permitir utilizar productos que se administran en dosis múltiples y que pueden recibir, durante su periodo de utilización, una contaminación cruzada exógena.

ELECCIÓN DEL CONSERVADOR

La farmacopea francesa presenta una lista de conservadores, autorizados en todas las concentraciones algunos o con límites máximos de concentración. Las diferentes guías o farmacopeas publicadas en otros países dan igualmente listas útiles. Aun cuando se hayan dado ciertas autorizaciones en este campo, parece prudente evitar la utilización de aldehídos como el formaldehído el glutaraldehído, incluso para los productos eliminados durante el uso por lavado, en razón de los posibles efectos cancerígenos de esos productos. Características de algunos conservadores utilizados en cosméticos o en medicamentos.

INTERPRETACION-REVALIDACION



El estudio de la capacidad conservadora de un producto no estéril permite, en general, prever la evolución de la comunicación de productos bien fabricados (contaminación inicial débil) o correctamente utilizados (de dosis múltiples de capacidad limitada para una duración de uso razonable).

Parece indispensable revalidar frecuentemente la formulación si las condiciones de fabricación y la calidad de las materias primas se mantienen.

Es igualmente indispensable concebir esta determinación como un conjunto del cual forma parte la evaluación de la calidad microbiológica de los productos terminados y de las materias primas cuyo seguimiento riguroso asegura la calidad global del producto.

FACTORES QUE INTERESA CONTROLAR EN LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En condiciones normales, es posible tener diversas cepas de una sola especie a partir de colecciones de cultivos, como la *National Collection of Industrial and Marine Bacteria* la *National Collection of Type Cultures*. También en los laboratorios de los hospitales pueden encontrarse cepas diferentes procedentes de muestras tomadas de pacientes infectados o de alimentos contaminados productos cosméticos o farmacéuticos u otras muchas fuentes. Es posible que las cepas obtenidas de esta forma muestren variaciones en cuanto a sus resistencias a los agentes químicos antimicrobianos. Las cepas obtenidas de infecciones humanas o animales suelen ser más resistentes a los antimicrobianos, en especial a los antibióticos, que las procedentes de otras fuentes. De la misma forma, las cepas obtenidas a partir de medicamentos contaminados pueden ser más resistentes a los agentes químicos conservantes que las procedentes de colecciones de cultivos. Por tanto, para conseguir resultados que puedan ser reproducidos en distintos laboratorio, es necesario especificar la cepa del microorganismo utilizado para efectuar las determinaciones.

Ello se debe a que las características del microorganismo (entre ellas la resistencia a los antimicrobianos químicos) puede cambiar de manera progresiva tanto por mutaciones como por la selección natural que pueden sufrir las muchas generaciones producidas a lo largo de los meses o años de cultivos en el laboratorio.

TORONJA



La toronja, también conocido como pomelo o pamplemusa, es el fruto del árbol homónimo que pertenece al género Citrus de la familia de las Rutáceas. Esta familia comprende más de 1.600 especies. El género botánico Citrus es el más importante de la familia, y consta de unas 20 especies con frutos comestibles, todos ellos muy abundantes en vitamina C, flavonoides y aceites esenciales.

EXTRACTO DE SEMILLA DE TORONJA COMERCIAL

Se define como un bactericida y fungicida sistémico de origen orgánico natural, con especial efectos de prevención y conservación en procesos industriales donde es aplicado.

La principal composición química de este consta de extracto de semilla de cítricos. Es un producto orgánico natural, cuyo ingrediente activo constituye el extracto de semilla de cítricos. Dicho ingrediente activo es un compuesto muy complejo, el cual está estabilizado físicamente e integrado por pequeñas trazas de elementos químicos naturales tales como:

- Ácido ascórbico (vitamina C)
- Bioflavonoides de cítricos.

Esta sustancia provoca una inhibición y cambios complejos en la permeabilidad de la membrana celular. De manera que decodifica e interfiere en los mensajes químicos de las enzimas y las proteínas desdobladas de los nutrientes esenciales de los patógenos. Actúa sobre el dióxido de carbono de las células bacterianas y fúngicas, reduciéndolo y oxidándolo, provocando daños en el citoplasma y la membrana celular, impidiendo así la multiplicación de los patógenos. Por lo complejo y por los puntos de acción, la posibilidad de resistencia es mínima.

Su acción residual es benéfica para la salud de plantas y el ser humano, a diferencia de otros agentes que pueden ser irritantes o tóxicos durante un uso prolongado.

DESCRIPCIÓN DEL EXTRACTO DE SEMILLA DE TORONJA COMO PRESERVANTE

La necesidad de añadir agentes preservantes es común en gran parte de la industria alimentaria actual. Se describe un nuevo preservante de origen natural, producto de la más avanzada tecnología que por primera vez se le presenta como una opción al alcance de los tecnólogos, industriales y profesionales.



El término preservante por ser parte no solo del vocabulario técnico, sino del uso general, tiene un significado mucho más amplio. Por ello restringimos el significado a las capacidades de bactericida, fungicida, preservante y antioxidante, las cuales son funciones que con más frecuencia debe de cumplir un agente preservante, ya que la en los fenómenos de oxidación y de putrefacción son los mayores causantes de las características organolépticas y del valor de un producto.

MICROORGANISMOS DE PRUEBA

ECHERICHIA COLI

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: Escherichia

Especie: *E.coli*

E.coli, se trata de una bacteria Gram-negativo, catalasa-positiva, oxidasa-negativa, anaerobia facultativa, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa y su prueba de IMVIC es ++--.

SALMONELLA

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Salmonella*

Salmonella, es un género de bacteria formado por bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos y que no desarrollan cápsula ni esporas. Son bacterias



móviles que producen sulfuro de hidrógeno (H₂S). Fermentan glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa, y no producen ureasa.

SHIGUELLA

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Shigella*

Shigella es un género de bacterias con forma de bastoncillo Gram negativas, no móviles, no formadoras de esporas e incapaces de fermentar la lactosa, que puede ocasionar diarrea en los seres humanos. Fueron descubiertas hace 100 años por el científico japonés Kiyoshi Shiga, de quien tomó su nombre.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Reino: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Staphylococcaceae

Género: *Staphylococcus*

Especie: *S. aureus*

Es un coco que crece agrupado en racimos (de ahí su raíz "Staphylo"), que responde positivamente a la tinción de Gram, es aerobio y anaerobio facultativo por lo que puede crecer tanto en una atmósfera con oxígeno y también sin el mismo, no presenta movilidad ni forma cápsula. Es catalasa positivo y coagulasa positivo.

El *S. aureus* es un coco inmóvil, de 0.8 a 1 micrómetro de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas. En extendidos de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o en cadenas cortas.



Los racimos irregulares son característicos de extendidos tomados de cultivos que se desarrollan en medios sólidos, mientras que en otros cultivos son frecuentes las formas de diplococos y en cadenas cortas.

Unas pocas cepas producen una capsula o capa de baba que incrementa la virulencia del microorganismo. El *S. aureus* es un microorganismos gram-positivo, pero las células viejas y los microorganismos fagocitados se tiñen como gram-negativos.

CANDIDA ALBICANS

Reino: Fungi

Filo: Deuteromiceta

Subfilo: Saccharomycotina

Clase: Saccharomycetes

Orden: Saccharomycetales

Familia: Saccharomycetaceae

Género: *Candida*

Especie: *C. albicans*

La *Candida albicans* es un hongo diploide asexual (forma de levadura), saprófito de la familia de los Sacaromicetos.

Normalmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Está envuelta en un rol relevante en la digestión de los azúcares mediante un proceso de fermentación.

MEDIOS DE CULTIVOS

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua, usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias varias.

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta: sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir ni *in Vitro* ni *in vivo*. También se debe



añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) no son completamente autótrofos cuando se desarrollan en estas condiciones.

MEDIOS SÓLIDOS

Medio sólido es todo aquel que contiene un agente gelificante. La dureza del medio depende principalmente de dos factores:

1. Agar: es una mezcla de polisacáridos extraídos de un alga marina. Tiene una elevada masa molecular, tiene la capacidad de hidratarse y formar una red. El agar interactúa con los componentes nutritivos del medio. El agar se funde a altas temperaturas (100 °C), Solidifica alrededor de los 40 °C y no se degrada con la luz. Generalmente se utiliza a una concentración de 0,6 – 1%. El principal problema con este gelificante es su elevado costo.
2. Gelrita: es un heteropolisacárido aniónico natural producido por una bacteria, que forma geles semejantes al agar. Se puede usar a una concentración de 0,15 – 0,30%. Los geles de gelrita son notablemente más claros que los de agar, y también cuajan más rápidamente. El costo de la gelrita es menor que el del agar.

MEDIOS DE CULTIVO SEGÚN SABORAUD:

Para cultivo, aislamiento e identificación de hongos patógenos, modificado según SABORAUD.

Los medios de cultivo de este tipo son especialmente adecuados para dermatófitos, en tanto que para levaduras y mohos son preferibles los que contienen maltosa. Los medios de cultivo líquidos, de SABORAUD, sirven ante todo para efectuar los controles de esterilidad y para la realización de los procedimientos basados en la utilización de filtros de membrana.

Forma de actuación:



Estos medios de cultivo facilitan el crecimiento de hongos, merced a concentraciones relativamente altas (2 ó 4%) de carbohidratos. No contienen ninguna sustancia que actúe selectivamente sobre la flora indeseable de acompañamiento. Para inhibir el crecimiento de bacterias, se ajusta a 5,6 el valor del pH. Este efecto es potenciable ajustando el Ph a valores extremos (cercanos a 3,5 a 10,0).

AGAR DE DIGERIDO DE CASEÍNA-SOJA

El Agar de Soya Trypticaseína provee un excelente soporte de crecimiento para organismos aerobios y anaerobios, según lo demostró Leavit en 1955. Este medio es recomendado en los procedimientos microbiológicos de control de aguas, cosméticos y en la industria farmacéutica.

En este medio las peptonas proveen la fuente de nitrógeno y minerales. El azúcar de la Peptona de Soya provee la fuente de carbohidratos. El Cloruro de Sodio tiene su función en el balance osmótico y el Agar es incorporado como agente solidificante.

FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivos utilizados deben contener todos los nutrientes requeridos para el microorganismo a cultivarse y ciertos factores como temperatura, PH óptimo de crecimiento, aereación que deben ser controlados cuidadosamente.

Los agares son polisacáridos que se extraen de algas marinas y son particularmente adecuados para el cultivo microbiano, porque resiste la acción microbiana, generalmente se disuelven a 100°C, pero no forman gel hasta que se enfría por debajo de 45°C.

Para muchos microorganismos un solo compuesto (como un aminoácido) puede servir como fuente de energía, otros requieren compuestos diferentes.

Es importante a su vez considerar el PH óptimo para cada especie, generalmente los microorganismos neutrófilos crecen mejor a PH 6-8, algunos acidófilos tienen PH óptimo tan bajo como 3 y otros alcalófilos PH altos como 10.5.

La temperatura es otro aspecto importante que varía ampliamente, las formas psicrófilas



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

COMPOSICIÓN Y PH DEL MEDIO DE CULTIVO

Existen varios métodos para valorar la actividad antimicrobiana, pero en todos se mide la inhibición del crecimiento del microorganismo estudiado cuando se añade el antimicrobiano químico al medio de cultivo. En estos casos, la composición y el pH del medio pueden influir en los resultados.

El pH influye sobre el grado de ionización y, por tanto, en su solubilidad en los lípidos y, en ultimo termino, en su efecto antimicrobiano.

SUSPENSIONES NORMALIZADAS O ESTANDARIZADAS / PREPARACIÓN DE L INOCULO.

La estandarización de las suspensiones de microorganismos proporciona una metodología de trabajo que facilita la obtención de los resultados esperados. Normalmente, la farmacopea para ensayos de recuperación microbiana en presencia de productos (validación de la esterilidad o grado de contaminación) indica que se siembre un número determinado de microorganismo de cultivos recientes.

FÓRMULAS FARMACÉUTICAS DE PRODUCTOS FITOTERÁPICOS

CONSIDERACIONES GENERALES

Los conocimientos y las técnicas de fabricación, preparados a partir de sustancias activas obtenidas por vías sintéticas, son aplicables en un todo a los productos naturales puros. Los productos fitoterápicos debido a su naturaleza, merecen consideraciones y cuidados adicionales.

Prácticamente todas las formas farmacéuticas pueden ser preparadas a partir de extractos:



1. formulaciones líquidas como gotas, jarabes, soluciones o suspensiones para las capsulas blandas de gelatina.
2. formulaciones sólidas como los comprimidos, comprimidos recubiertos, capsulas de gelatina y gránulos.
3. preparaciones semi-sólidas para uso externo, como por ejemplo, las cremas, lociones, pomadas y supositorios.

En la selección de la forma farmacéutica de un producto fitoterápico, los aspectos principales que deben tenerse en cuenta son los siguientes:

- La forma debe ser aceptable para el paciente.
- La forma debe ser química y físicamente estable.
- El producto debe ser correctamente envasado.
- El producto debe estar exento de contaminación microbiana
- El producto debe ser capaz de proporcionar una dosis correcta de la droga
- El producto debe ser terapéuticamente eficaz; y
- El proceso debe ser económico para la fabricación en gran escala.

La fabricación de formas farmacéuticas de productos fitoterápicos debe obedecer a las Buenas Prácticas de Fabricación. El fabricante debe elaborar los productos fitoterápicos garantizando que estos estén bajo la legislación vigente y debe asumir la responsabilidad por la calidad de cualquier producto por él elaborado.

Una definición práctica se desprende de las dos raíces de la palabra “fitofármaco”: “fito” procede del griego y significa planta, “fármaco” es el medicamento.

Por lo tanto, en términos generales los fitofármacos son medicamentos que contienen como principio activo exclusivamente plantas, partes de plantas, ingredientes vegetales o bien, preparaciones obtenidas a partir de ellas.

Una característica de los fitofármacos es que están constituidos de principios activos y de otros materiales que coexisten con ellos en las plantas, formando mezclas más o menos complejas. Los componentes de los fitofármacos pueden ser los que originalmente se encontraban en la planta o aquellos derivados de las transformaciones sufridas por los componentes originales a través de los procesos a los que las plantas fueron sometidas.



Los cambios que ocurren a los componentes de las plantas pueden ser de naturaleza física, fisicoquímica o química. Los cambios pueden ocurrir sin ninguna intención o específicamente orientados para obtener ciertas transformaciones que por alguna razón se deseen.

Los procesos de fabricación de los fitofármacos incluyen etapas de separación de componentes que se podrían considerar indeseables tales como la clorofila, los taninos y las resinas, entre otros. Estas etapas se continúan hasta que se alcanza un enriquecimiento selectivo de los principios activos que se considera satisfactorio.

ACERCA DE LAS BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA DE FITOFÁRMACOS

Las buenas prácticas de manufactura son pautas universales aplicadas en la producción farmacéutica. Los fitofármacos no tienen consideraciones especiales, pero existen algunas peculiaridades en el complejo de la producción y del control de calidad de los mismos.

Cualquier tratamiento utilizado para reducir la contaminación debe ser documentado. Los detalles del proceso deben ser reflejados, así como los límites de los residuos.

1. Con relación a las especificaciones del Producto Final, se exige que: El ensayo de control debe ser tal que refleje la determinación cualitativa y cuantitativa de la composición de los ingredientes activos y las especificaciones son dadas utilizando marcadores si se desconocen los constituyentes activos, de lo contrario, deben especificarse y determinarse cuantitativamente.
2. Si el producto final contiene más de una materia vegetal o preparaciones de diversas drogas vegetales y no es posible la determinación cuantitativa de cada ingrediente, se efectúa la evaluación de la mezcla total.
3. Si el producto contiene varios materiales vegetales o preparaciones de diferentes materiales de plantas y si no es posible determinar la estabilidad de cada ingrediente activo, puede evaluarse por el perfil cromatográfico, y otros métodos de ensayos.

FORMAS TRADICIONALES DE PREPARACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS

De acuerdo a los manuales de Medicina Natural, existen diversas técnicas para extraer los principios activos de las plantas medicinales.



Estas formas de preparación reciben el nombre de Tisanas y se clasifican en 4 grupos generales, de acuerdo a la porción de la planta utilizada:

- Infusión: Se aplica a las partes blandas de la planta (hojas, flores). Consiste en poner las hojas limpias en un recipiente resistente al calor y agregar agua hirviendo en cantidad proporcional (500 cc para 10 gr.).

Se tapa el recipiente y se deja reposar durante 10 minutos. Se pasa luego por colador y está lista para emplear.

- Decocción: Se aplica a las partes duras de la planta (raíces, corteza). Se agrega agua fría a una cantidad de corteza en un recipiente resistente al calor (500 cc para 5 gr.). Se hierve a fuego lento durante 3 a 5 minutos. Se retira del fuego y se deja reposar durante 10 minutos. Se pasa luego por colador y está listo para emplear. Al producto de este procedimiento se le llama Decocto.
- Maceración: Se aplica tanto a las partes duras como a las partes blandas. Se colocan las partes desmenuzadas en un recipiente con agua hervida fría en una cantidad proporcional. Se dejan reposar durante 6 horas si se trata de partes blandas y 12 horas si se trata de partes duras. La ventaja de este procedimiento es que no se inactivan los principios activos termo sensible de la planta.
- Cataplasmas: Se aplica tanto a las partes duras como a las partes blandas. La base de las Cataplasmas es la harina o chuño, a las cuales se agrega un macerado de las hojas o corteza. Se mezclan las partes con agua para obtener una pasta uniforme y se pone al fuego en un recipiente resistente al calor, moviendo la mezcla constantemente.

Luego se extiende una capa uniforme de la mezcla sobre un paño limpio (pañal) y se cubre con una gasa delgada. Una vez que ha perdido suficiente calor para no quemar la piel, se aplica caliente sobre el cuerpo sobre la zona afectada. Se sustituye cuando ha perdido el calor por otra nueva.

- Tinturas: Las tinturas se definen como soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas preparadas con drogas vegetales o con sustancias químicas.



Las tinturas son medicamentos líquidos oficinales, o no oficinales, coloreados, transparentes, resultantes de la acción disolvente del alcohol etílico o mezclas hidroalcohólicas sobre drogas frescas, secas, vegetales o animales. El término de tintura deriva del hecho de colorearse el alcohol usado en la obtención de estos medicamentos, debido a los principios activos extraídos.

Las tinturas se preparan por lixiviación, maceración, solución o dilución. Los menstruos empleados en las tinturas son: alcohol etílico a diferentes concentraciones, agua, mezclas de alcohol o agua amoniacal. Los menstruos deberán disolver los elementos terapéuticamente valiosos de las drogas.

FORMAS FARMACEUTICAS LIQUIDAS

Las formas farmacéuticas líquidas pueden ser preparadas a partir de tinturas y extractos vegetales. Los extractos vegetales utilizados pueden ser fluidos, blandos o secos. Los extractos fluidos deben diluirse y los extractos blandos y secos deben ser disueltos en el solvente de jarabes y gotas. Esta es la etapa más difícil de la fabricación, porque pueden formarse precipitados como consecuencia de la solubilidad poco satisfactoria de los principios activos o de los componentes secundarios en el solvente escogido. Para evitar este problema, deben tomarse algunas medidas:

1. Para diluir un extracto fluido o una tintura o para disolver un extracto blando o seco, se debe emplear el mismo solvente utilizado en su fabricación.
2. Cuando esto no sea posible, se puede conseguir una mayor solubilidad utilizando co-solventes como por ejemplo, glicerina, sorbitol, jarabe de glucosa, glicoles y poliglicoles. El uso de co-solventes no siempre da resultados satisfactorios, a veces, para conseguir la solubilización se deben emplear cantidades elevadas de los mismos, lo que no siempre es posible en una formulación específica, en estos casos se pueden utilizar surfactantes no iónicos, como por ejemplo, los polisorbatos y, derivados del ácido oleico y aceite de ricino.
3. Cuando se trata de principios activos cuya solubilidad aumenta cuando estos forman sales, las variaciones de pH pueden mejorar la solubilidad y al estabilidad de algunos extractos. En el caso particular de los alcaloides se utilizan los ácidos cítrico, láctico y



tartárico. El pH en la banda de 4 a 5 en formulaciones que contienen extracto de belladona, no solo produce soluciones físicamente estables, sino también previene la racemización o la hidrólisis de los alcaloides derivados del tropano.

4. La filtración es un proceso que remueve todas las sustancias insolubles de un extracto. Sin embargo, es necesario considerar que la filtración también puede remover los principios activos.

Siendo así, esta operación debe limitarse para aquellos productos que son fácilmente solubles en el solvente escogido y que no sufren pérdidas en el proceso de filtración.

GOTAS

Es la forma más común de administrar tinturas, tinturas madres, extractos fluidos y aceites esenciales, tanto en forma individual como en mezclas complejas.

Generalmente, las mezclas de tinturas y extractos se utilizan directamente, administrando un determinado volumen en un recipiente con agua.

Las formulaciones en gotas raramente presentan problemas de conservación o de empleo para los pacientes. Sin embargo, frecuentemente tienen un aspecto poco atractivo y el sabor es desagradable. La modificación del sabor no siempre se consigue agregando edulcorantes o utilizando otros extractos, como por ejemplo, el de regaliza, que mejora el gusto de preparaciones amargas.

JARABES

Son preparaciones farmacéuticas acuosas, límpidas, que contienen 85% de sacarosa en agua destilada. La alta concentración de azúcar en los jarabes, además de sus propiedades energéticas y edulcorantes, tiene un papel conservante y, debido a la baja constante dieléctrica, facilita la disolución de los componentes de la preparación. Para favorecer la solubilidad de los componentes de la preparación y retardar la cristalización del azúcar se puede agregar sorbitol o glicerina a la fórmula de jarabe.

El jarabe preparado solamente con azúcar y agua se denomina jarabe simple y se utiliza como vehículo para jarabes medicamentosos, aromáticos y en la preparación de recubrimientos para las grageas.

TIPOS:



- Simple
- Medicamentoso

Son preparaciones farmacéuticas acuosas, límpidas, que contienen 85% de sacarosa en agua destilada. La alta concentración de azúcar en los jarabes, además de sus propiedades energéticas y edulcorantes, tiene un papel conservante y, debido a la baja constante dieléctrica, facilita la disolución de los componentes de la preparación.

Para favorecer la solubilidad de los componentes de la preparación y retardar la cristalización del azúcar se puede agregar sorbitol o glicerina a la fórmula de jarabe.

El jarabe preparado solamente con azúcar y agua se denomina jarabe simple y se utiliza como vehículo para jarabes medicamentosos, aromáticos y en la preparación de recubrimientos para las grageas.

Suele ser el vehículo para la preparación de jarabes medicamentosos. Es el conjunto de agua destilada y sacarosa en proporciones 360 - 640 (sacarosa) para 1000 cc. En la elaboración hay que tener cuidado con el calor para evitar la caramelización del azúcar, el jarabe se volvería ligeramente oscuro, puede dar esto mismo también alteraciones cuando el jarabe simple se usará para preparar jarabes medicamentosos y que se usarán durante largo tiempo.

El jarabe simple se define como líquido viscoso, incoloro, inodoro y densidad 1,32

OTRAS FORMULACIONES LIQUIDAS

ELIXIRES

Son soluciones medicamentosas alcohólicas, edulcoradas con azúcar. La concentración alcohólica en los elixires varía entre 15% y 50°, razón por la cual difícilmente se presenta desarrollo de microorganismos. Además de la sacarosa los elixires pueden ser edulcorados con sacarina o glicerina.

Para la preparación de un elixir se disuelve el principio activo en alcohol y a esta solución se le agrega agua, en la forma de jarabe o de una solución adecuada de sacarosa.

(Principio activo + alcohol) + (Agua + sacarosa) = elixir



Para aumentar la viscosidad y evitar la precipitación de los principios activos puede usarse glicerina la cual actúa además como edulcorante.

PROCEDIMIENTO PARA ELABORACION DE JARABE SIMPLE

El jarabe simple es una solución de azúcar al 85%. Puede prepararse en frío o en caliente. La preparación en frío consiste en disolver 850 g de sacarosa en 500 ml de agua con agitación mecánica. Sin embargo, el proceso más utilizado es el de la preparación en caliente. La incorporación de las tinturas y de los extractos vegetales se lleva a cabo después del enfriamiento del jarabe simple.

En el proceso de la preparación en caliente se emplea la misma proporción de sacarosa y de agua destilada utilizada en el proceso de la preparación en frío. La operación se realiza a una temperatura de 80°C, en baño-maría o en baño de vapor circulante. Los ingredientes se introducen en un recipiente y este se coloca en baño-maría, donde se mantiene bajo agitación permanente, hasta que todo el azúcar se disuelva.

En las operaciones industriales, el calentamiento se realiza con aparatos provistos de una camisa de vapor, de varios tamaños, equipados con agitadores mecánicos.

La preparación en caliente presenta como ventaja la velocidad de disolución del azúcar, la eliminación del anhídrido carbónico del agua durante el proceso de calentamiento y la esterilización de la preparación. Sin embargo, la temperatura no debe superar los 80°C pues se corre el riesgo de caramelizar el jarabe.

Los jarabes preparados en caliente pueden presentarse más o menos coloreados, debido a la caramelización de la sacarosa. La intensidad del color es directamente proporcional a la temperatura de la operación y al tiempo de calentamiento.

PRESERVANTES PARA JARABES



Para evitar proliferación microbiana se utilizan sustancias preservantes. Las más utilizadas son los esteres del ácido parahidroxibenzoico: metilparabeno en una concentración de 0,2% y propilparabeno en una concentración de 0,05%.

Es común utilizar las mezclas de los dos esteres del ácido p-hidroxibenzoico, porque con esta mezcla se obtiene un efecto antimicrobiano mayor. En la preservación de jarabes frecuentemente se emplea 0,18% de metilparabeno y 0,02% de propilparabeno.

CONSERVADORES MÁS USADOS PARA JARABES

Para evitar proliferación microbiana se utilizan sustancias preservantes. Las más utilizadas son los esteres del ácido parahidroxibenzoico: metilparabeno en una concentración de 0,2% y propilparabeno en una concentración de 0,05%.

Es común utilizar las mezclas de los dos esteres del ácido p-hidroxibenzoico, porque con esta mezcla se obtiene un efecto antimicrobiano mayor. En la preservación de jarabes frecuentemente se emplea 0,18% de metilparabeno y 0,02% de propilparabeno.

ANTIMICROBIANOS O CONSERVADORES SINTÉTICOS

La mayoría de los productos actuales para el cuidado personal son a base de agua y como tales proporcionan un atractivo medio para el desarrollo de microbios. Hay dos puntos potencialmente peligrosos cuando la contaminación puede ocurrir en la cadena de abastecimiento:

1. Durante la manufactura del producto.
2. Cuando el cliente usa el producto.

Todos los fabricantes deben asegurarse de que sus productos sean seguros y no presenten un riesgo para los clientes debido a la contaminación de cualquier fuente.

La actitud de la industria cosmética en los Estados Unidos previa a los años 60 era que si un producto no olía mal y se veía bien, era un buen producto. Esta actitud cambió a mediados de los 60 cuando comenzaron a probarse los productos para el cuidado de la piel y el cabello contra la contaminación microbiana.

COMPONENTES DE UNA FORMA MEDICAMENTOSA:



- Principio activo
- Excipiente
- Intermediario de solubilidad
- Modificadores del pH
- saborizantes
- Aromatizantes
- Colorantes
- Conservantes

Disolver el azúcar en la sustancia medicamentosa, solo es posible si los principios activos tienen naturaleza líquida, caso de extractos. Si no se hace así resultaría un jarabe de una densidad inferior a la prescrita.

EXCIPIENTES Y AUXILIARES DE FORMULACION DE ORIGEN NATURAL

Excipientes y auxiliares son sustancias que ayudan en la formulación farmacéutica dando a la forma farmacéutica las características deseadas de estabilidad, peso, volumen, viscosidad y velocidad de desintegración, etc. Actúan incluso como diluyente, aglutinante, lubricante y agente de corrección de color y de sabor.

Los excipientes son inertes, no deben tener actividad farmacológica propia y no deben inhibir ni aumentar la actividad del principio activo; en el caso de excipientes líquidos, estos no deben interactuar con el material del envase. Su uso no se limita a la tecnología de productos fitoterápicos.

La mayor parte de los excipientes y auxiliares son de origen natural: vegetal, animal o mineral, algunos modificados por semi-síntesis. Cada excipiente se define por sus características físico-químicas y por sus características tecnológicas, las cuales determinan su uso en tecnología farmacéutica. Los principales excipientes y auxiliares de origen natural, así como sus usos se anotan a continuación:



HIPÓTESIS

El presente trabajo plantea como hipótesis que el producto natural evaluado posee actividad conservadora a las concentraciones ensayadas en comparación a estudios in vitro para el producto evaluado.

DISEÑO METODOLOGICO

Tipo de Estudio:

El presente estudio es de tipo experimental y comparativo.

Área de Estudio:

La realización de los estudios se llevaron a cabo en Laboratorio Mauricio Díaz Muller Ubicados en Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN-León y en área de control microbiológico de medicamentos del departamento de análisis ubicado en la facultad de ciencias químicas. El trabajo Monográfico se inicio en el mes de Febrero-Abril 2009.

Universo:

1. Población:

Todas la especies vegetales que posean actividad antimicrobiana o posean actividad conservadora.

2. Muestra:

Extracto de semilla de toronja solución comercial 5%.



Unidad de Análisis:

Extracto de semilla de toronja contenido en un jarabe de carao.

MATERIAL Y EQUIPO

Para la realización de la práctica de este trabajo se utilizó durante el desarrollo lo siguiente:

Material del laboratorio:

Cristalería
Balanza
Cocina
Incubadora
Autoclave
Horno
Mechero
Espátula
Gradilla metálica

Material de laboratorio descartable:

Algodón
Papel de aluminio
Guantes
Boquillas
Zapatos y gorros quirúrgicos



Reactivos:

Agar: Trypticaseína soja, Saboraud

Peptona en agua

Solución salina

PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACION DE JARABES:

Para la realización de la propuesta de formulación se diseñaron dos lotes pilotos a fin de evaluar el comportamiento del conservador:

Estos dos lotes estaban hechos de diferentes compuestos:

Lote A: estaba compuesto de Jarabe simple, Parabenos (propil y metil parabeno), tintura de carao. En el lote A se realizaron 20 jarabes de 50ml:

1. Primero se peso 680g de sacarosa.
2. Luego se le agrego 371.6ml de agua para realizar el jarabe simple, haciéndose este en frío y haciendo uso de un agitador eléctrico.
3. Mientras estaba en agitación el jarabes simple, se le agregaron 200ml de tintura de carao.
4. Seguidamente se le agregaron los parabenos, de metil parabeno se le agrego 0.479 y de propil parabeno 0.15g.
5. Cuando se homogenizo el jarabe se agrego a los frascos de color ámbar 50ml de jarabe.

Lote B: este estaba compuesto por Jarabe simple, tintura de carao y conservador natural de semilla de toronja. A una concentración de 100µg/ml.

En el lote B se realizaron 20 jarabes de 50ml:

1. Se utilizaron 663g de sacarosa.
2. Se mezclaron con agua destilada 362.31g, para hacer el jarabe simple, este también se hizo en frío.



3. Se adicionaron de tintura de carao 200ml, con constante agitación.
4. Por ultimo se le adiciono 20ml de Conservador natural de extracto de semilla de toronja a una concentración de 100µg/ml.

PROCEDIMIENTO DE TRABAJO EN EL ÁREA DE MICROBIOLOGIA

A- LIMPIEZA DE AMBIENTES

1. Se utiliza el método de esterilización por vapor, que consiste en inmersión de $KmnO_4$ 7g en 12ml de formaldehído dándose la reacción de desprendimiento de vapores, colocando esta mezcla en placas petri, hasta que la mezcla se evapore.
2. También se utiliza fenol al 1,2 y 3% para la limpieza de las mesas, incluyendo también las paredes y el piso
3. como tercer paso se utiliza alcohol al 70%, para limpiar las mesas, las paredes y el piso.

B- ELABORACION DE CUÑAS PARA PREPARACION DE MICROORGANISMOS

Se preparo agar Triptica caseína soja para el stock de cepas en forma de cuñas, esto para las bacterias, y se preparo Saboraud dextrosa para levaduras.

1. Se preparó 100ml de los agares TCS y Saboraud dextrosa luego se transfirió 10ml a cada tubo de rosca, para ser esterilizadas a 121°C, se deja reposando sobre una base inclinada a temperatura ambiente,
2. Al solidificarse se toma una asada del microorganismos a prueba ATCC (centro de cultivo tipo americano) cultivándolo en las cuña, luego las que contienen bacteria
3. Se incuban a una temperatura de 35 a 37°C durante 24hrs, y para las de levadura se incuban a una temperatura de 20 a 22°C durante 5 a 7 días.



C- ELABORACION DE SUSPENSIONES DE MICROORGANISMOS

Para la realización de las suspensiones se realiza primero la calibración del espectrofotómetro utilizando solución salina estéril a 0.9 %, y pH 7 colocándolo en una celda para que actúe como blanco,

1. se calibra a 580nm y 25 de transmitancia.
2. Partiendo de la cuñas de microorganismos se toma varias asadas a un tubo de ensayo con 9ml de solución salina hasta lograr una turbidez, luego se agita en el bortex y se adiciona a otra celda para las mediciones en espectrofotómetro, tomando varias medidas hasta lograr que la suspensiones obtengan 25 de transmitancia.

D- PREPACION DE MEDIOS CULTIVO

Tomamos el medio selectivo para cada microorganismo de prueba luego detalladamente se verifica fecha de vencimiento, su pH óptimo y número de lote, luego verificamos la cantidad de gramos por litro a preparar, sacando los cálculos correctos, para luego pesarlo en gramos llevándolo al volumen deseado, ponemos agua destilada a ebullición adicionándolo con una probeta al volumen deseado luego agitamos vigorosamente hasta lograr la disolución completa del medio, para luego verificar si el pH es el correcto.

PREPARACION DE SOLUCION SALINA

Para la preparación de solución salina se pesan 9 g de NaCl para 1000ml de solución salina, se ajusta el pH a 7 y se distribuye en tubos de ensayos con 9ml de solución, a estos se les coloca una tapas de algodón y se meten al autoclave para su esterilización a una temperatura de 121°C por 15 minutos, luego se deja temperatura ambiente y los que no se van a utilizar se mete a refrigeración.

PREPARACION DE LA PECTONA

Para la preparación de la peptona en agua como diluyente se pesan 8.5g de NaCl, luego se pesa 1g de bactopectona, estas se mezcla con agua destilada se agita vigorosamente para su completa disolución, se afora a 1000ml, y se mide el pH a 7, luego se distribuyen en elermeyer 90ml y 9ml en tubos de ensayos, se le coloca tapas para meterlo al autoclave y ser esterilizados.



E- ESTERILIZAR DE MEDIOS DE CULTIVO

Se distribuye en cada elermeyer el medio en volúmenes de 200ml, colocándole una tapa de algodón envuelta en aluminio, luego se le coloca una retapa de aluminio para ser esterilizados en el autoclave a una temperatura de 121°C por 15 minutos. Al finalizar la esterilización se lleva a baño maría a 45°C para evitar su solidificación.

F- LAVADO CRISTALERIA

Una vez descontaminados en el autoclave la cristalería utilizada, se enjuagan para quitarles los residuos para luego depositarlos en una tina que contiene agua con cloro y jabón líquido dejándolos por 24 horas, después se pastean uno por uno y se enjuagan con abundante agua para quitarles completamente el jabón y se dejan secar a temperatura ambiente.

G- ESTERILIZACION DE MATERIALES Y CRISTALERIA

Se empaca las cajas o plato petri con aluminio en paquetes de 10 placas, las pipetas se empacan también en aluminio en paquetes de tres según su volumen, se colocan en el horno por 2 horas a 180°C (vía seca).

En la esterilización de vestimenta para introducirse al área de siembra o de ensayo se envuelven en papel aluminio las gabachas, gorro, boquillas y guantes para llevarlos al autoclave a una temperatura de 121°C por 15 minutos.

PROCEDIMIENTO MICROBIOLÓGICO

PROCEDIMIENTO DEL RECuento DE COLONIAS DE LAS SUSPENSIÓN DE MICROORGANISMOS.

Una vez que teníamos preparado todos los materiales a utilizar y la vestimenta correcta nos dispusimos a entrar al cuarto de siembra, donde empezamos con la limpieza de las mesas y paredes para asegurar la limpieza total del ambiente, seguidamente encendimos el mechero y empezamos a trabajar en el ensayo donde realizamos los siguientes pasos:

1. Rotulación de los tubos de ensayos marcada con el número de la disolución que le correspondía y así mismo a las placas que tendrían una muestra de esa disolución.
2. Agitamos la suspensión madre en el bortex para después tomar con una pipeta estéril 1ml de esta y transferirlo a un tubo de ensayo que contiene solución salina



correspondiente la dilución 10^{-2} , agitándolo para después tomar 1 ml de este y llevarlo a otro tubo de ensayo siendo esta la dilución 10^{-3} repitiendo este mismo proceso hasta llegar a la dilución 10^{-11} .

3. Al terminar las diluciones tomamos 1ml de cada dilución desde 10^{-1} hasta 10^{-6} para transferirlo en placas petri por duplicado cada dilución, este mismo procedimiento se realizó en las diluciones 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} .
4. Luego se procedió a agregarle aproximadamente de 9 ml de agar TCS a las placas que contienen bacterias y Saboraud a las que contienen levadura. También se agregó agar a unas placas para realizar el control de ambiente y el control de los medios.
5. Cubrir las placas petri, rotando suavemente para su homogenización, y dejar que el contenido se solidifique a una temperatura ambiente. Invertir las placas e incubar durante 24 horas las de bacterias a una temperatura 35 a 37°C y 72 para las de levadura a una temperatura de 20 a 22°C.
6. 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 2 placas de cada dilución por cada microorganismos, en términos de números de microorganismos por ml de muestra.

ENSAYO DE LIMITE MICROBIANO

Se procedió a realizar el límite microbiano a fin de descartar contaminación de los lotes durante la elaboración de los mismos, y evitar posibles causas que puedan afectar la veracidad de los resultados

Para la realización del ensayo de límite microbiano, a los jarabes de caao se tomó una muestra de cada lote A y B, procediéndose de la siguiente manera:

1. Se realizó la limpieza del lugar de trabajo.
2. Rotulación de los elermeyer y de los tubos de ensayo de acuerdo al número de dilución que correspondía y las placas que contenían agar TCS y Saboraud para las muestra que se tomara de cada una de las diluciones de los jarabes.
3. Del jarabe que corresponde al lote A se tomó 10ml con una pipeta estéril para transferirlo a un elermeyer que contiene 90ml de agua peptonada correspondiente a



la dilución 10^{-1} , de esta dilución se tomo 1ml para transferirlo a un tubo de ensayo que contiene 9ml de peptona en agua siendo esta la disolución 10^{-2} , de esta ultima dilución se tomo 1ml para transferirlo a otro tubo de ensayo que tiene peptonada en agua que seria esta la dilución 10^{-3} .

4. De cada dilución se tomo 1ml para transferirlo a una placa con TCS y otro ml a una con Saboraud, y cada una por duplicado.
5. Luego se procedió a agregarle aproximadamente de 9 ml de agar a las placas que les correspondía TCS y a las de Saboraud. También se agrego agar a unas placas para realizar el control de ambiente y el control de los medios.
6. Cubrir las placas petri, rotando suavemente para su homogenización, y dejar que el contenido se solidifique a una temperatura ambiente. Invertir las placas e incubar durante 24 horas las de bacterias a una temperatura 35 a 37°C y 72 para las de levadura a una temperatura de 20 a 22°C.
7. Una vez finalizada la incubación, examinar las palcas para verificar el crecimiento de microorganismos, contar el numero de colonias y expresar el promedio de las 2 placas de cada dilución por cada microorganismos, en términos de números de microorganismos por ml de muestra.
8. Todo este procedimiento se le realizo igual a las muestras del lote B

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

MÉTODOS DE ESTUDIO CHALLENGE TEST

El método propone medir si la concentración utilizada en una formulación de un producto que refiere propiedades conservadoras inhibe a dicha concentración los microorganismos ensayados para la prueba.

Para lo cual conociendo el recuento previo de ufc contenidas en la suspensión de microorganismos ensayados se establece el criterio para establecer si el producto a la concentración ensayada es efectivo.

PROCEDIMIENTO DE INOCULACION DE LOS JARAEBS PARA DETERMINAR LA INHIBICION DE MICROORGANISMOS



Para la realización del ensayo microbiológico de los jarabes, inoculados con los microorganismos Echerichia coli, Salmonella, Staphylococcus aureus, Shiguella y Candida albicans, donde el Lote A, contiene conservador sintético (parabenos) y el lote B conservador natural (extracto semillas de toronja a una concentración de 1000 µg/ml), se realizaron los siguientes pasos:

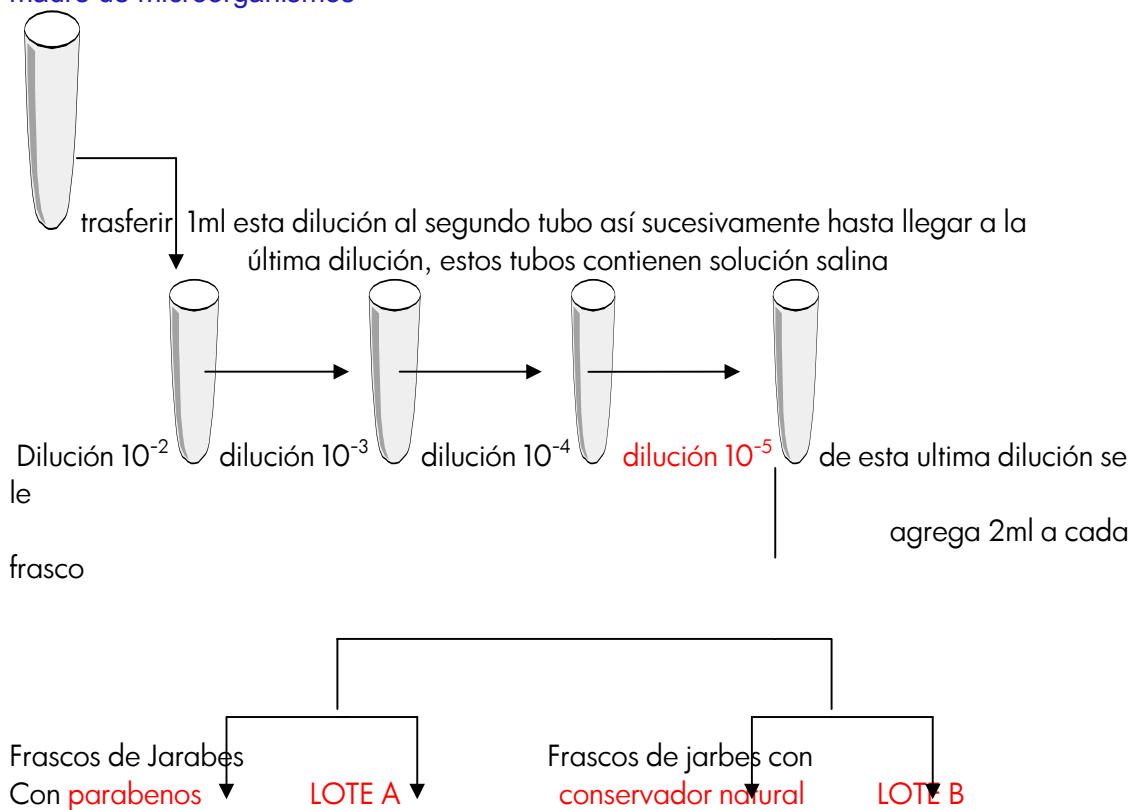
1. Se realizó la limpieza del ambiente.
2. Rotulación de tubos de ensayo, placas petri, jarabes.
3. Limpieza de las tapas de los jarabes.
4. Realizar el proceso de diluciones de cada microorganismo, desde la suspensión, 10^{-1} hasta la disolución 10^{-5} , dicha disolución será con la que se va a inocular los jarabes.
5. Teniendo las diluciones de los 5 microorganismos, para los 2 lotes de jarabes de los cuales se tienen que tomar 10 frascos por cada lote, e inocular 2 frascos por cada microorganismos, agregándole 2ml de la dilución 10^{-5} a cada frasco,
6. Posteriormente se dejan reposando los jarabe por 15 minutos, luego se toman un 1 ml para cada placa, por duplicado.
7. Luego se procedió a agregarle aproximadamente de 9 ml de agar a las placas que les correspondía TCS y a las de Saboraud. También se agrego agar a unas placas para realizar el control de ambiente y el control de los medios.
8. Cubrir las placas petri, rotando suavemente para su homogenización, y dejar que el contenido se solidifique a una temperatura ambiente. Invertir las placas e incubar durante 24 horas las de bacterias a una temperatura 35 a 37°C y 72 para las de levadura a una temperatura de 20 a 22°C.
9. Una vez finalizada la incubación, examinar las palcas para verificar el crecimiento de microorganismos, contar el numero de colonias y expresar el promedio de las 2 placas de cada dilución por cada microorganismos, en términos de números de microorganismos por ml de muestra.

Todo el procedimiento anterior se repitió con la dilución 10^{-5} de cada uno de los microorganismos.



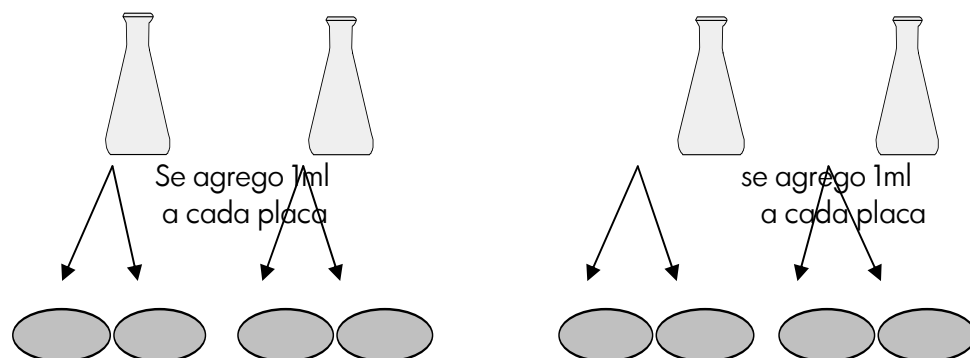
ESQUEMATIZACIÓN DE PROCEDIMIENTO EN LA INOCULACIÓN DE LOS JARABES

Suspensión madre de microorganismos





Concentración *in vitro* de un agente conservador natural en un filtratopico



A las placas también se les agregó agar, ya sea de Trypticaseína soja o de Saboraud, se deja en reposo en la incubadora por 24 horas para las bacterias y 72 para los hongos para posteriormente hacer la lectura.

RESULTADOS Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Tabla 1

Recuento de suspensiones de microorganismos en dilución de 10^{-6} a las 24 horas a excepción de la Candida Albicans leída a las 78 horas.

Microorganismos	Diluciones					
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Echerichia Coli	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml
Salmonella	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml
Staphylococcus Aureus	>300 ufc/ml	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml
Shiguella	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml	> 300 ufc/ml
Candida Albicans	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300



	ufc/ml	ufc/ml	ufc/ml	ufc/ml	ufc/ml	ufc/ml
--	--------	--------	--------	--------	--------	--------

La presente tabla muestra como la concentración inicial para las suspensiones ensayadas muestra un recuento mayor de 300 ufc/ml considerando el inoculo inicial de la suspensión madre, observando que no fue posible el conteo de colonias, por lo cual se procedió a realizar un numero mayor de diluciones a fin de establecer un recuento contable para establecer el punto de partida en la inoculación de los lotes de producto.

Tabla 2

Recuento de Suspensión de microorganismos en diluciones de 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} en 24 horas.

Microorganismos	Diluciones		
	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}
Echerichia Coli	12 ufc/ml	0 ufc/ml	0 ufc/ml
Salmonella	17 ufc/ml	0 ufc/ml	0 ufc/ml
Staphylococcus Aureus	5 ufc/ml	0 ufc/ml	0 ufc/ml
Shiguella	10 ufc/ml	0 ufc/ml	0 ufc/ml

Tabla 3

Recuento de Suspensión de microorganismos en diluciones 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} leída a las 48 horas.

Microorganismos	Diluciones		
	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}
Echerichia Coli	13 ufc/ml	0 ufc/ml	0 ufc/ml
Salmonella	18 ufc/ml	0 ufc/ml	0 ufc/ml
Staphylococcus Aureus	15 ufc/ml	0 ufc/ml	0 ufc/ml



Shiguella	12 ufc/ml	5 ufc/ml	0 ufc/ml
Candida Albicans	0 ufc/ml	0 ufc/ml	0 ufc/ml

Tabla 4

Recuento de la Candida Albicans en otras diluciones

Microorganismos	Diluciones			
	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Candida Albicans	>300 ufc/ml	19 ufc/ml	0 ufc/ml	0 ufc/ml

Al realizar más diluciones a las suspensiones de microorganismos se pudo ver que el número de colonias en las placas petri eran contables lo cual se reflejaron en las tablas anteriores. Se realizó el conteo a las 24 y a las 48 horas observando que solo creció en la dilución 10^{-9} a excepción de la Shiguella que se noto también un crecimiento en la dilución 10^{-10} a las 48 horas.

También se pudo observar que el microorganismos que tubo mayor crecimiento fue la salmonella tanto en la lectura de 24 horas como en la de 48 horas, demostrando que la salmonella tiene mayor proliferación en comparación de los otros bacterias.

Con respecto a la Candida albicans se pudo observar que en las diluciones de la tabla nº 3 no hubo crecimiento por lo tanto se realizó un montaje con menos diluciones donde se observo crecimiento en la dilución 10^{-6} y 10^{-7} , pero solo en esta ultima se pudieron contar el número de colonias y en las diluciones siguiente no hubo crecimiento.

Tabla 5

Ensayo de límite microbiano realizado al lote A.

Ensayos realizados	Resultados	Especificaciones
Límite Microbiano		
Escherichia Coli	Ausencia	Ausencia
Salmonella	Ausencia	Ausencia
Staphylococcus aureus	Ausencia	Ausencia
Shiguella	Ausencia	Ausencia
Candida Albicans	Ausencia	No mas de 10 UFC/ml

Tabla 6

Ensayo de límite microbiano realizado al lote B.



Ensayos realizados	Resultados	Especificaciones
Limite Microbiano		
Escherichia Coli	Ausencia	Ausencia
Salmonella	Ausencia	Ausencia
Staphylococcus aureus	Ausencia	Ausencia
Shiguella	Ausencia	Ausencia
Candida Albicans	Ausencia	No mas de 10 UFC/ml

Al realizar el ensayo de límite microbiano al lote A y B, se pudo comprobar que los jarabes no tenían ningún tipo de contaminación bacteriana o de cualquier otro tipo, dejando notar que los procedimientos realizados y la vestimenta utilizadas durante su elaboración fueron los correctos.

También así se pudo asegurar que el ensayo que se le realice a estos lotes no se verán influenciados por algún tipo de contaminación que pudieron haber presentado estos productos terminados.

Tabla 7

Resultados obtenidos posterior a la inoculación de los lotes con la suspensión de microorganismos

Microorganismos	LOTE A	LOTE B
24 horas		
Echerichia Coli	Ausencia	Ausencia
Salmonella	32 ufc/ml	50 ufc/ml
Staphylococcus Aureus	Ausencia	Ausencia
Shiguella	6 ufc/ml	15 ufc/ml
48 horas		
Candida Albicans	28 ufc/ml	18 ufc/ml

Al realizar el ensayo donde se inoculo los lotes de jarabes, pudimos observar crecimiento de colonias contables en algunos de los microorganismos tales como Salmonella y Shiguella, este crecimiento se observo tanto en el lote A como en el B, pero se pudo notar nuevamente que en la salmonella hubo mayor proliferación que en los demás



microorganismos; con respecto a la *Candida albicans* que se leyó a las 48 horas se observó crecimiento de colonias las cuales también fueron contables tanto en el lote A como en el B. Dejando ver que el conservador natural utilizado no pudo inhibir completamente a los microorganismos, así como también los parabenos que no pudo inhibir completa los microorganismos, observándose solamente inhibición completa en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, esto puede deberse a la concentración utilizada, puede ser que los productos necesitaran conservador a mayor concentración tanto para conservador natural como para el sintético.

CONCLUSION

Una vez realizado el ensayo microbiológico para evaluar la concentración de 1000µg/ml del conservador natural comprobando su capacidad de inhibir cepas de microorganismos en un producto fitoterapéutico jarabe de carao, pudimos llegar a las conclusiones siguientes:

- La concentración utilizada del conservador en el producto fitoterápico únicamente inhibe el crecimiento para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, a la concentración ensayadas en el recuento a las 24 horas manteniéndose la correlación con la concentración in vitro de 1000 µg/ml observándose ausencia total de colonias, mientras que para *Shiguella*, *salmonella* y *Candida albicans* si hubo crecimiento, dejando ver que la respuesta no fue igual en el ensayo in vitro como en el fitoterápico.
- La concentración utilizada no es la correcta para inhibir completamente a los microorganismos, por lo tanto sería adecuado utilizar una concentración mayor.
- Al relacionar el conservador natural con el sintético ambos en concentración de 1000 µg/ml los resultados muestran inhibición para las cepas *E. Coli*, y *St. Aureus* y existe un valor de colonias mas reducido en el sintético para *Shiguella*, *salmonella* y



Candida albicans, cabe señalar que solamente la Escherichia coli y Staphylococcus aureus se ven inhibidos completamente por ambos conservadores.

RECOMENDACIONES

Al concluir este trabajo quisimos realizar una serie de recomendaciones para el área de microbiología y/o para los estudiantes que vayan a trabajar en esta área, esto con el fin de que sigan trabajando correctamente y puedan obtener buenos resultados, también realizamos recomendaciones para los alumnos que quieran continuar con este estudio de conservadores naturales.

- Mantener el ambiente siempre estéril, acondicionar adecuadamente el cuarto de siembra para asegurar que los resultados obtenidos en los ensayos realizados sean los correctos.
- Seguir con este estudio para realizar la efectividad y la estabilidad del conservador natural.
- También se debería seguir el estudio de este conservador natural pero a concentraciones mayores para ver si puede inhibir completamente los microorganismos.



BIBLIOGRAFIA

- ✚ Appendix XVI D. Microbiological quality of pharmaceutical preparations. British Pharmacopoeia. Volumen IV. 2007.
- ✚ Arias.T.D. Glosario de Medicamentos: Desarrollo, Evaluación y Uso. Primera Edición. Organización Panamericana de la Salud. USA. 1999.
- ✚ García G. Mildred. Legislación en Iberoamérica sobre Fitofármacos y Productos Naturales. CYTED. Costa Rica, 2000.
- ✚ Handbook of pharmaceutical excipients. Second Edition. Edited by:Ainley Wade and paul.J.Woller. American pharmaceutical association. Washington 1994.
- ✚ Secretaría de Salud Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. México. 2001.
- ✚ The United States Pharmacopeia 30 and The Nacional Formulary 25. Thrirty Edition. The United States Pharmacopeial Convention Inc. USA. 2007.



ANEXOS



Concentración in vitro de un agente conservador natural en un fitoterápico



Concentración in vitro de un agente conservador natural en un fitoterápico

Clase química	Conservadores	Concentración habitual (%)	Contenido límite para los medicamentos (%) farmacopea francesa X	Observaciones
Ácidos y sales	Acido ascórbico (NaK)	0.1 a 0.3	Todas las concentraciones	Actividad limitada a los productos ácidos (pH≤6) Evitar la vía ocular Concentración límite para el producto o para la mezcla con sus ésteres Concentración limitada a la formación de complejos por las impurezas metálicas presentes
	Acido isoascórbico (NaK)	0.1 a 0.3	Todas las concentraciones	
	Acido sórbico (NaK)	0.05 a 0.2	Todas las concentraciones	
	Acido benzoico (NaK)	0.05 a 0.3	0.2	
	Acido propionico (NaK)	0.05 a 0.3	Todas las concentraciones	
	Acido parahidroxibenzoico (NA)	0.05 a 0.15	0.15	
	Acido edético (y derivados)	-	-	
Esteres (parabenos)	Metil parahidroxibenzoico	0.001 a 0.15	0.15	Actividad limitada a los productos ácidos (pH≤6) Incompatible con los agentes catiónicos Concentración limitada a 0.15% para el producto o en mezcla con el ácido parahidroxibenzoico con uno de sus ésteres Muy poco solubles en el agua
	Etil parahidroxibenzoico	0.001 a 0.15	0.15	
	Propil parahidroxibenzoico	0.001 a 0.25	0.15	
	Butil parahidroxibenzoico	0.001 a 0.15	-	
	Galato de propilo, octilo o dodecilo	0.01	0.01	
Fenoles	Fenol	0.5	0.5	Para soluciones inyectables no esterilizables por calor Para soluciones inyectables no esterilizables por calor Para soluciones inyectables no esterilizables por calor Incompatible con agentes catiónicos Inactivo contra <i>Pseudomonas</i> , evitar para preparaciones acuosas estable al calor
	Cresol	0.3	0.3	
	Clorocresol	0.3	0.3	
	butilhidroxitolueno	0.01	0.01	
	para clorometaxilenol (Ottasept)	0.2 a 0.6	-	
	2-hidroxi triclorodifenil oxido (Irgasan DP 300)	0.5 a 1	-	



Concentración in vitro de un agente conservador natural en un fitoterápico

Amonios cuaternarios	Cloruro de benzalconio	0.005 a 0.05	-	Incompatibles con agentes aniónicos y preparaciones ricas en proteínas Inactivo contra <i>Pseudomonas</i> , debe ser evitado Riesgo cancerígeno, inactivo por las proteínas
	Cloruro de benzetonio	0.01 a 0.02	-	
	Cloruro de cetil-piridinium	0.01 a 0.02	-	
Aldehídos	Formaldehido	0.05 a 0.1	-	Riesgo cancerígeno, inactivo por las proteínas Actividad limitada a los productos ácidos (pH≤6)
	Glutaraldehido	0.01 a 0.05	-	
Diversos	2-bormo-2-nitropropanediol (Bronopol)	0.01 a 0.5	-	Frecuentemente utilizados en asociación con los derivados para hidroxibenzoicos volátil, no autorizada vía parental Evitar la vía ocular Compatible con derivados tensoactivos
	Derivados imidazol urico (Germal II y Germal 115)			
	Alcohol etílico	1 a 20	20	
	Alcohol benzílico	0.1	0.1	
	Anhidro sulfuroso, sulfitos, bisulfitos y metasulfitos	0.1	0.1 (en SO ₂)	
	Glicerol		Todas las concentraciones	
Derivados tiazolina (Kathon CG)	0.02 a 0.13	-		

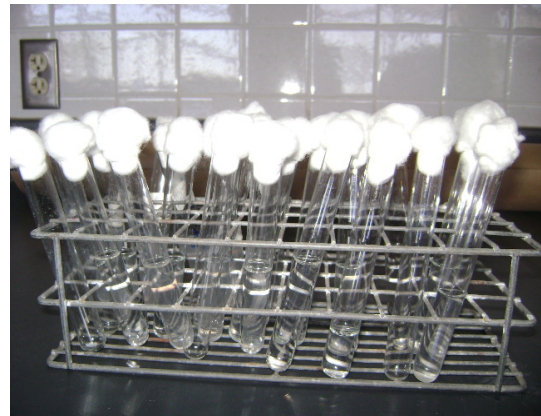


Cepas utilizadas, según las farmacopeas o referencias utilizadas

	farmacopea Francesa	Farmacopea Británica	Farmacopea Estadounidense
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	+	+	+
Staphylococcus aureus ATCC 6538	+	+	+
Aspergillus niger ATCC 16404	+	+	+
Candida albicans ATCC 10231	+	+	+
Escherichia coli ATCC 8739	+	-	+



FOTOS DE LA PRÁCTICA.



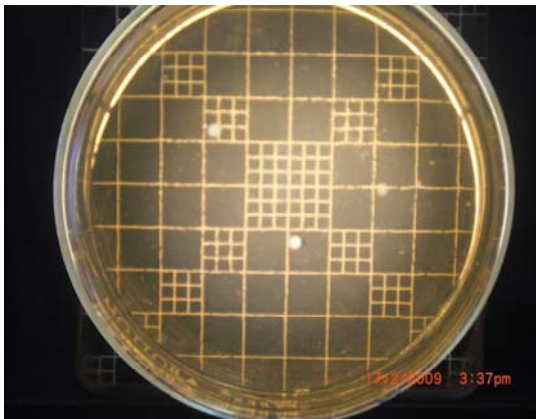


FOTOS DE LOS RESULTADOS.

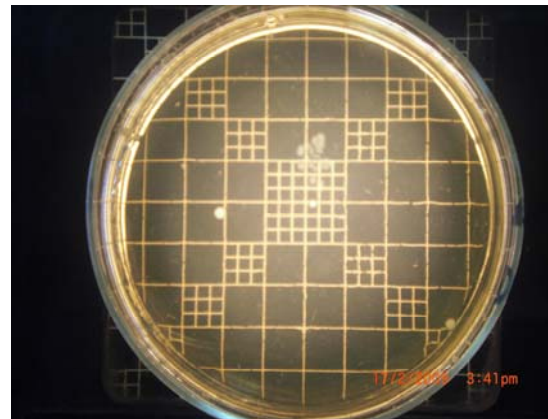
Estafilococcus aureus en la dilución 10^{-4} Candida Albicans en disolución 10^{-3}



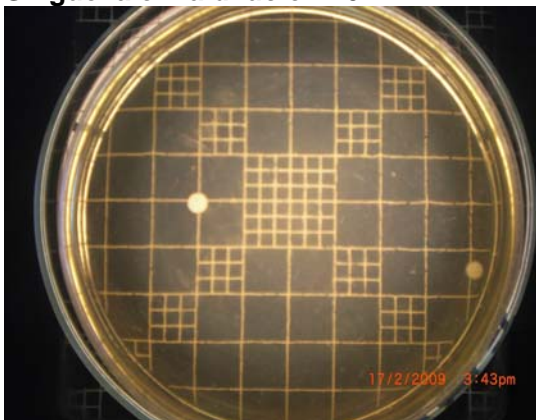
E. coli en dilución 10^{-9}



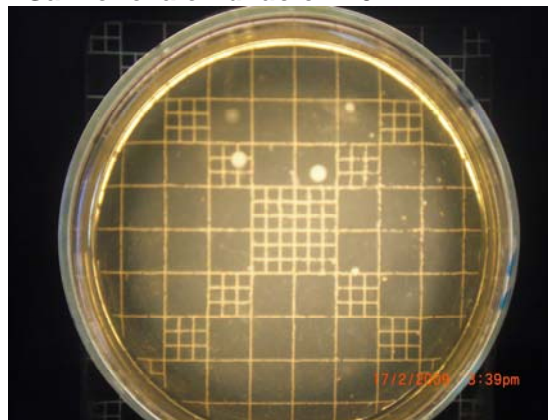
St. aureus en la dilución 10^{-9}



Shiguella en la dilución 10^{-9}

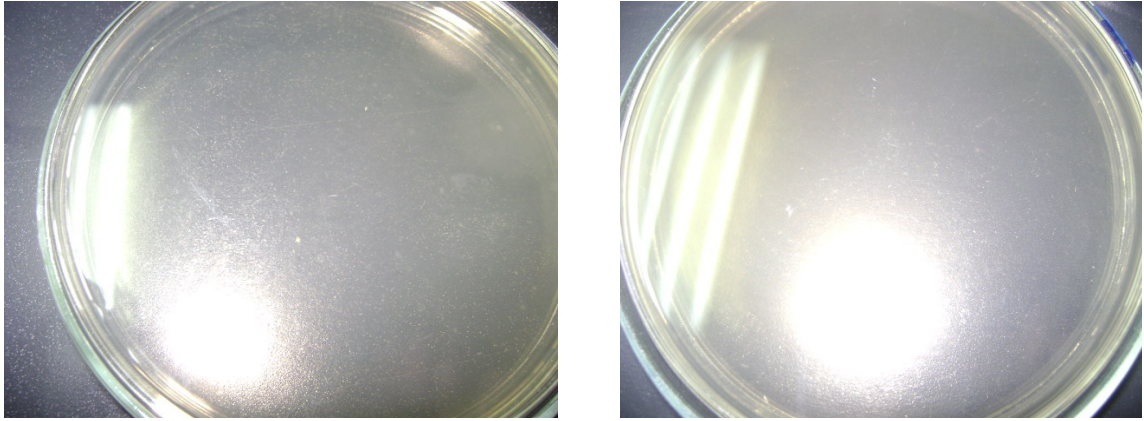


Salmonella en dilución 10^{-9}

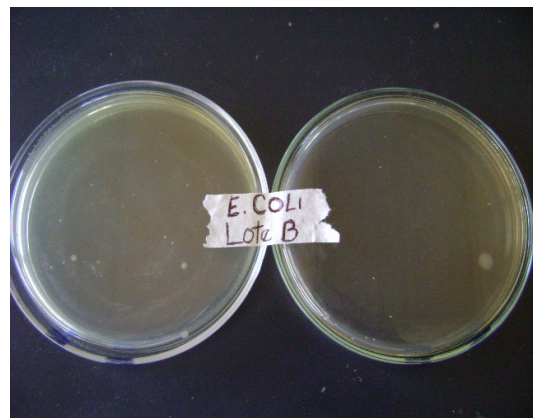
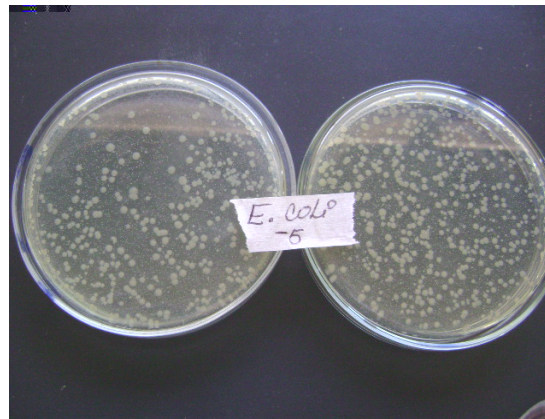




LIMITE MICROBIANO

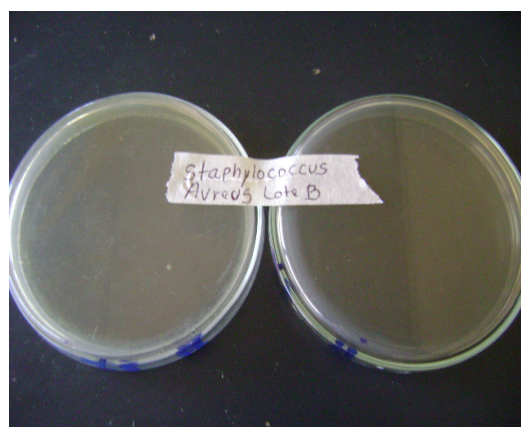
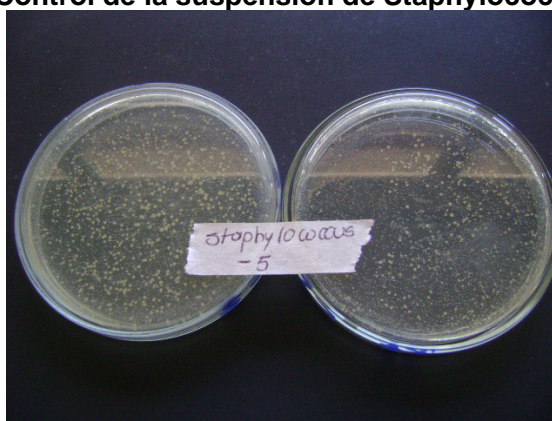


RESULTADO DE LA INOCULACION DE LOS JAREBE

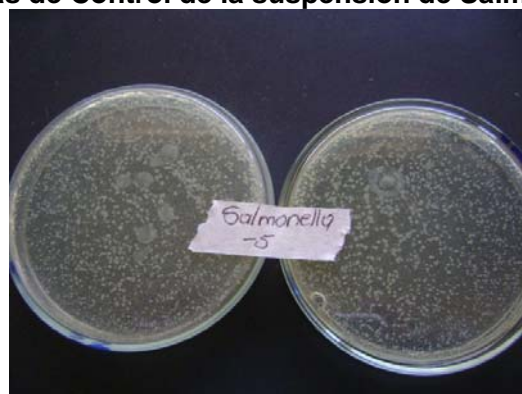




Placas de Control de la suspensión de Staphylococcus aureus



Placas de Control de la suspensión de Salmonella





Placas de control de la suspensión de Shiguella en la disolución 10^{-5}

