

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE FARMACIA**



2014: Por la pertinencia y la Excelencia Académica

Evaluación de la Calidad en los extractos de *Zingiber officinale*, *Passiflora incarnata*, *Petiveria alliacea L*, comercializadas en Farmacias Herbolarias de León, mediante la utilización de métodos biológicos.

**MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO QUÍMICO
FARMACÉUTICO.**

AUTORES:

Marissela de los Ángeles Darce Urcuyo

Clarisa Elena Delgado

Hugo Cristopher Delgado Real

Tutor: MSc. Gloria María Herrera

León. Julio 2014

A la libertad por la Universidad

Agradecimientos

A Dios:

Por haber sido nuestra fuente de sabiduría, fortaleza y esperanza para culminar nuestra carrera.

A nuestros Padres:

Por habernos brindado en todo momento su apoyo incondicional y su amor a lo largo de nuestras vidas.

A nuestra Tutor:

Por la paciencia y el esmero que tuvo con nosotros durante nuestro trabajo monográfico, por habernos dado el privilegio de ser nuestra guía en este arduo trabajo.

A Todos los Licenciados:

Por habernos transmitido sus conocimientos a lo largo de nuestra carrera, por sus sabios consejos y su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales. También agradecemos a los responsables del Laboratorio de Microbiología por habernos brindado su ayuda y tiempo durante nuestro trabajo de investigación.

A nuestra Alma Mater UNAN-LEÓN:

Por habernos dado la oportunidad de finalizar nuestra carrera con éxito.

Los Autores.

Dedicatoria.

A Dios porque durante todos estos años me ha dado la fortaleza y sabiduría, por la fe que ha puesto en mí para culminar mi carrera con éxito.

A mis padres por ser el pilar incondicional, brindarme su amor en todo momento, por sus consejos alentadores, su perseverancia y por ser un apoyo económico.

A mi hermana Juliet por ser mi compañera y mi consejera para salir adelante en este trayecto universitario.

A mis compañeros de trabajo por toda la paciencia y esmero que pusieron en este trabajo investigativo, por compartir sus conocimientos y por su valioso tiempo.

Marissela Urcuyo.

Dedicatoria

Le doy gracias a Dios y nuestra Madre Santísima por haberme permitido llegar hasta donde hoy en día he llegado, por haberme dado la gracia de culminar mi segunda carrera, por la sabiduría y fortaleza en los momentos donde ya no quería seguir, por todo su amor y misericordia.

A la mujer que siempre ha luchado para que yo cumpla mis metas, ella que ha sido padre y madre, que con su amor me ha sabido guiar y hacer de mi una mujer de bien, a ella le debo todo lo que soy hoy, gracias mami Gloria Delgado te amo.

A mis hermanos que a pesar de la distancia siempre han estado conmigo en todo momento apoyándome.

A mis amigos que a lo largo de la carrera han estado conmigo siempre, brindándome su ayuda, cariño y paciencia.

A todas las personas de una u otra manera me han ayudado a cumplir un sueño más de muchos por cumplir.

Clarisa Delgado.

Dedicatoria

A Dios por haberme dado el don de la vida, por la fortaleza y sabiduría que me ha dado a lo largo de estos años.

A mi madre Meryluz Real por la paciencia y apoyo que me ha brindado en mis años como estudiante y por forjarme como persona de buenos valores.

A mi padre Hugo Andrés Delgado por siempre estar ahí cuando más lo necesitaba.

A mis hermanos porque a pesar de los malos momentos siempre fueron fuente de apoyo durante toda mi vida.

A mis Amigos que siempre están ahí cuando los necesito apoyándome y dando ánimo para seguir adelante.

A todos los momentos que siempre fueron indispensables para ser mejor persona.

Hugo Delgado

Índice.

1. Introducción.....	1
2. Planteamiento del problema.....	9
3. Objetivos.....	10
4. Marco Teórico.....	11
5. Material y métodos.....	54
6. Resultados y análisis de resultados.....	63
7. Conclusiones.....	69
8. Recomendaciones.....	71
9. Referencias bibliográficas.....	73
10. Anexos.....	78

Introducción.

Las plantas con propiedades medicinales fueron las primeras medicinas usadas por el hombre, se utilizan como fitofármacos y se definen como todas aquellas que contienen en alguno de sus órganos mezcla de compuestos químicos como responsable de la actividad farmacológica y que administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos. La Organización Mundial de la Salud ha promocionado la medicina tradicional y ha dado pautas para su control de calidad, de manera que estos medicamentos herbarios sean seguros y eficaces.⁸

Actualmente en el mercado de los medicamentos existe un creciente uso de los productos naturales como terapia alternativa para diversas enfermedades, representan cerca del 25% del total de las prescripciones médicas en los países industrializados y más del 70 % de las personas en el mundo, dependen de la medicina complementaria y alternativa, además en los países en desarrollo el uso de plantas medicinales representa cerca del 80 % del arsenal terapéutico y actualmente es un área en franca expansión.⁸

Dentro de la industria farmacéutica existe una gran variedad de sustancias medicinales cuya finalidad es mantener o restablecer la salud del hombre. La garantía de calidad reviste una importancia especial, y esta fabricación debe seguir estrictamente métodos de preparación y procedimientos establecidos y validados cuidadosamente. Se sabe que los productos farmacéuticos pueden llegar a ser contaminados por varios elementos en diferentes puntos a lo largo de la línea de manufactura; la carga microbiana de los productos finales puede representar la contaminación de las materias primas, de los equipos con los cuales fueron elaborados, del ambiente, de las personas que operaron durante el proceso o de los envases dentro de los cuales fueron empacados. Algunos de estos contaminantes pueden ser patógenos, mientras que otros pueden desarrollarse en presencia de preservantes y afectar el producto. Por lo que es recomendado realizarles ensayos en donde podamos determinar la carga microbiana de los productos no obligatoriamente estériles²²

Se han notificado efectos adversos debido a la utilización de medicamentos herbarios por sobredosificación, contaminación, adulteración, etc. La contaminación natural y la proveniente de las actividades humanas hicieron necesario monitorear los niveles de metales pesados en las hierbas medicinales⁹

Estos metales pueden provenir por estar en los suelos de manera natural o como resultado de fuentes antropogénicas, como por ejemplo la presión atmosférica, uso de suelos contaminados, deposición de envases metálicos, aplicación de fertilizantes y pesticidas, así como también el uso de combustibles fósiles, fundiciones y otras técnicas que liberan metales al medio ambiente y que luego serán depositados en los suelos y en la vegetación⁸

El creciente desarrollo industrial y urbano ha traído consigo la aparición de una cantidad apreciable de sustancias químicas tóxicas, lo cual afecta tanto la salud humana como la de los ecosistemas en países desarrollados y en vías de desarrollo. Recientemente se han instrumentado bioensayos rápidos con el empleo de plantas como organismos de prueba, los que funcionan como buenas herramientas de pesquisa inicial. Se señalan las ventajas que tienen las plantas para ser incorporadas en baterías de ensayo para medir alarma de peligro ambiental. Se destaca la importancia del empleo de bioensayos con plantas en la detección y control de los contaminantes tóxicos ambientales²

Un instrumento alternativo y que complementa los tradicionales análisis químicos para la determinación de toxicidad de muestras ambientales es la utilización de bioensayos, ya que los organismos vivos presentan alguna respuesta a niveles peligrosos de cualquier sustancia química o mezcla compleja de tóxicos presentes. Los bioensayos in vitro han ganado aceptación en las estrategias de biomonitoreo, fundamentalmente porque suministran resultados confiables, son costo-efectivos, simples y rápidos. Estos bioensayos pueden auxiliar en la evaluación de los efectos a la salud (toxicidad humana y animal) y de los efectos ecológicos de millares de sustancias químicas tóxicas que son introducidas por varias vías en el ambiente y permiten su aplicación en programas de monitoreo en la evaluación de la toxicidad.²

Las pruebas de toxicidad aportan una conexión esencial entre la química ambiental (la presencia de sustancias donde no deben estar o en concentraciones mayores a las basales, medidas a través de análisis químicos) y la ecotoxicología (presencia de sustancias que causan efectos biológicos adversos medidos en organismos individuales a través de pruebas de toxicidad y en poblaciones).¹

El uso de diferentes compuestos naturales para el tratamiento primario de las enfermedades ha ido en aumento; la mayoría de estos compuestos no tiene estudios de toxicidad suficientes que validan su uso terapéutico. Los bioensayos se consideran pruebas eficaces para evaluar los efectos tóxicos de diferentes sustancias con el uso de plantas, la prueba de *Allium test* es un bioensayo para detectar contaminantes y sustancias potencialmente tóxicos para la salud. Varios estudios han demostrado un potencial significativo para el diagnóstico.²⁸

Esta investigación servirá como punto de referencia para esta clase de pruebas en Nicaragua, ya que actualmente los estudios realizados sobre esta temática son escasos. Con este trabajo pretendemos realizar una revisión actualizada de la información existente sobre dos de los bioensayos con plantas medicinales más comercializadas con fines terapéuticos para evaluar su fitotoxicidad y el grado de afectación que se pueden presentar en el organismo.

Los ensayos biológicos han sido largamente estudiados, siendo uno de los métodos más utilizados para evaluar la toxicidad de un sinnúmero de sustancias químicas en aguas de consumo. A continuación mencionaremos algunos estudios realizados por diferentes investigadores.

En 1995, en la ciudad de Lima Perú la Bióloga Margarita Aurazo de Zumaeta y la Química María Luisa Esparza realizaron un ensayo de toxicidad aguda del cromo usando *Allium Cepa L.* proyecto en el cual se utilizó el *Allium test* ya mencionado para evaluar el daño tóxico y genotóxico causado por los diferentes niveles de cromo. Se trabajó con cromo 6

(dicromato de potasio) por considerar que bajo esta forma el cromo causa fuerte impacto negativo en el ecosistema acuático e interfiere en los procesos de degradación biológica. Así mismo, se consideró la posibilidad de que ocurra la oxidación de cromo 3 a cromo 6 en el suelo y lodos que están en contacto con efluentes de curtiembre, debido a que estos suelos son ricos en manganeso y oxidos.⁴

El proyecto dio como conclusión que el cromo 6 tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de la raíz de *Allium Cepa L*, el grado del efecto tóxico está relacionado directamente con la concentración del cromo. El índice mitótico es un indicador que permite cuantificar el efecto genotóxico del cromo sobre las células meristemáticas de la raíz de *Allium cepa L*. El cromo 6 produce aberraciones cromosómicas en las células meristemáticas de la raíz de *Allium cepa L*. La fragmentación cromosómica irreversible es la aberración predominante. El bioensayo con *Allium Cepa L* es una prueba útil para efectuar estudios de toxicidad aguda y genotoxicidad.⁴

Por otro lado, Tarazona Mirabal De la Universidad de Huánuco, Perú en el 2006, realizó un estudio sobre la toxicidad del cobre en la lechuga, para evaluar las aguas contaminadas, o mezclas complejas; en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días del crecimiento. Durante los primeros días de desarrollo de la planta ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica, puede alterar su desarrollo. Los procesos son generales para la mayoría de las semillas.⁵

El estudio dio como conclusión que la fitotoxicidad de cobre sobre lechuga, es decir que la concentración toxica de cobre al 50 % es de 70 partes por millón de Cobre; concentración con la cual se inhibe el 50 % de la germinación de lechuga. La concentración toxica de cobre al 50% de cobre que inhibe el 50 % del crecimiento radicular es de 90 parte por millón de Cobre y que sin embargo concentraciones que van del 5 a 20 parte por millón de cobre, favorecen su desarrollo.⁵

En junio del 2013 Diana M. Muñoz Solarte y Nancy Guerrero Pepinosa de la Universidad de Antioquía, Colombia, utilizaron el *Allium* test para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de extractos naturales en células meristemáticas de *Allium Cepa L.* Para estandarizar el bioensayo *Allium* test, fue necesario organizar tres réplicas con cuatro *Allium cepa L.* con meristemas apicales de dos centímetros de diámetro. Se realizaron los cortes y el montaje de cada muestra para el posterior análisis al microscopio. Los resultados obtenidos fueron que al usar *Allium* test, el mayor porcentaje de células se encuentran en interface con un 45%, seguido de un 42% de profase, lo cual evidencia una actividad normal del ciclo celular, se concluyó también que la estandarización del bioensayo *Allium* test en el laboratorio permitirá evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad de extractos de origen natural usados para el tratamiento primario de enfermedades¹⁰

En el 2006 en la Universidad de Concepción en Chile José Celis y colaboradores estudiaron el efecto de la adición de biosólidos urbanos y de salmonicultura sobre la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) en un suelo patagónico. En este estudio se analizaron los efectos sobre la germinación de semillas de lechuga como consecuencia de la aplicación de este tipo de biosólidos orgánicos en un suelo Andic cryofluvents degradado patagónico. Los biosólidos se adicionaron al suelo, los tratamientos fueron: lodo urbano (BU), biosólidos de piscicultura (BP) y biosólidos de salmonicultura en lago (BL) a diferentes tasas: 25, 50, 75, 100 y 150 Mg ha⁻¹. Se usó un testigo, consistente en suelo sin adición. Las pruebas a evaluar en el bioensayo en lechuga (*Lactuca sativa L.*) fueron el índice de germinación (IG), la longitud de la radícula y desarrollo del hipocotilo. Los resultados indicaron que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los biosólidos, donde los más altos valores de índice de germinación, crecimiento de radícula e hipocotilo fueron para biosólidos de salmonicultura en lago, seguido por biosólidos de piscicultura. Por el contrario, lodo urbano siempre estuvo por debajo del testigo (aunque con un IG > 80%), donde la tasa de aplicación de 150 Mg ha⁻¹ resultó con el menor valor bioindicador y el desarrollo del hipocotilo no fue observado.¹²

Wierzbicka (1999) en el Argentina, estudió el efecto del plomo en el *Allium cepa L.* y otras especies vegetales, evaluando la tolerancia constitucional o inherente, basada en sistemas

no específicos de desintoxicación del metal y la tolerancia inducida que surge como respuesta al estrés causado por un medio altamente contaminado determinando la adaptación de la especie al mismo. Los índices de tolerancia constitucional más elevados correspondieron a *Hordeum vulgare* y *Zea mays*; las especies más susceptibles al plomo fueron *Brassica napus* (colza), *Soja Hispida* (soja) y *Phaseolus vulgaris*; las especies de tolerancia intermedia fueron *Allium cepa L.*, *Triticumvulgare* (trigo), *Pisum sativum* (arveja), *Cucumis sativus* (pepino), *Lapinus luteus* (lupino amarillo), *Raphanus sativus* y *Scale cereale* (Centeno, grano).¹¹

Por otra parte se determinó una correlación buena entre los pesos secos y frescos del tallo con los índices antedichos en aquellas especies en que el crecimiento de la raíz fue inhibido seriamente sin registrarse variación significativa del peso del tallo, indicando ello que el plomo no provocaría efectos en las partes superiores de la planta. En todas las especies estudiadas, más del 90% del plomo asimilado permaneció en las raíces, reteniéndose solo entre el 2% y el 4% en el tallo; en *Allium cepa L.* desarrollada a partir de bulbos, solo un 54% permaneció en raíz, ubicándose el 46% restante en el bulbo y las hojas.¹¹

En 2012, Emilia Ruiz Moreno, Benita Urbina y Yadira Salmerón Mendoza en la UNAN-LEÓN Nicaragua, realizaron un estudio sobre la determinación de plomo en raíces de *Valeriana Officinalis*, *Smilax aspera*, *L. Panax Ginseng* mediante la marcha analítica y la biotoxicidad por *Allium Cepa L.* obteniendo como resultados del estudio de la marcha analítica que no se observaron resultados cuantitativos sin embargo debido a la presencia en las soluciones de coloración amarilla característica si se observo la formación de precipitados de yoduro de plomo en cada una de las soluciones en estudio. Y de manera cualitativa se demostró un tipo de reacción iónica permitiendo la formación del precipitado donde la variación de la solubilidad fue directamente proporcional con la temperatura, debido a que el yoduro de plomo 2 es un compuesto más soluble en caliente que en frío.¹⁵

Y en la determinación de la biotoxicidad por *Allium cepa L* se evaluó la presencia de plomo en las muestras analizadas mediante la inhibición del crecimiento de las raíces de *Allium cepa L*.¹⁵ para ello se utilizó como control negativo agua de grifo y un total de doce réplicas de las muestras en estudio, en las réplicas a las concentraciones de 0.5, 1, 1.5 de los extractos causaron importante inhibición del crecimiento de las raíces de *Allium cepa L* en comparación con el control negativo 1. La inhibición del crecimiento de las raíces fue mayor con el aumento de las concentraciones de los extractos.¹⁵

Al concluir el estudio se demostró que en relación a la marcha analítica, las muestras en estudio presentaron trazas de plomo debido al cambio de color, para confirmar la presencia de esta sustancia tóxica se precedió a realizar el Allium test, el cual provocó la inhibición de la división celular de los meristemas radiculares, lo cual impide el crecimiento normal de la raíz de *Allium cepa L*, y por tanto su elongación. Por lo tanto los resultados de este estudio evidencian que a pesar de que las raíces en estudio tienen efectos beneficiosos como una hierba medicinal, puede causar grandes problemas y daños a las células cuando se usan frecuentes e incorrectamente.

Hay componentes por los cuales algunos productos herbolarios no pueden ser consumidos por la población, entre los que se pueden destacar la presencia de Bacterias, Hongos y metales, en especial el Plomo, en las sustancias que se comercializan en distintos puntos de la geografía nacional; debido a que no cuentan con pruebas en donde se evalúen si son o no son tóxicos para el consumo humano. Además se puede decir que la presencia de plomo en el organismo es perjudicial para la salud de las personas ya que hay un sinnúmero de enfermedades causadas por este metal. Por lo cual, conscientes de la importancia que tienen en el transcurso del tiempo el uso de las plantas medicinales para curar cualquier tipo de enfermedad y de que su utilización en la actualidad va en aumento, con este estudio pretendemos determinar la fitotoxicidad y la determinación de Bacterias de algunos extractos a base de plantas medicinales (*Zingiber officinale*, *Passiflora incarnata*, *Petiveria alliacea L.*) que se comercializan en las farmacias herbolarias en la ciudad de León, utilizando métodos biológicos como el *Allium cepa L.* y la determinación del límite microbiano para productos no obligatoriamente estériles; en donde se pueda determinar la

presencia de algunas sustancias que sean tóxicas para el organismo humano y aportar a la población resultados sobre los posibles efectos tóxicos que consumen cuando se ingieren estos productos al igual de fortalecer nuestros conocimientos sobre una problemática actual.

Planteamiento del problema.

La presencia de metales, hongos y bacterias en plantas medicinales que más se utilizan con fines terapéuticos, rara vez cuentan con información relacionada a la calidad de sus componentes, por lo cual con este estudio nos planteamos:

Determinar la presencia de trazas de metales y microorganismos patógenos en los extractos a base de *Zingiber officinale*, *Passiflora incarnata*, *Petiveria alliacea L*, comercializados en las farmacias herbolarias de la ciudad de León, utilizando el Bioensayo de toxicidad aguda para la determinación de Plomo con el *Allium cepa L* y el Ensayo de Límite Microbiano para productos no obligatoriamente estériles.

Objetivos:

General:

Evaluar la calidad de los extractos de *Zingiber officinale*, *Passiflora incarnata*, *Petiveria alliacea L*, comercializados en Farmacias Herbolarias de la Ciudad de León mediante la utilización de métodos biológicos. Octubre 2013 - Junio 2014.

Específicos:

1. Determinar la fitotóxicidad de los extractos en estudio, mediante el Bioensayo del *Allium cepa L*.
2. Realizar el Ensayo de Límite Microbiano, para productos no obligatoriamente estériles para Identificar la presencia de bacterias patógenas y Hongos.
3. Analizar los Datos Obtenidos en el presente estudio.

Marco Teórico

Control de Calidad

La OMS recomienda que se establezcan criterios científicos y métodos que aseguren la calidad y eficacia de las preparaciones obtenidas a partir de plantas medicinales. Para la industria farmacéutica las plantas medicinales son una fuente de nuevas moléculas con efectos farmacológicos, que son utilizables directamente y que permiten obtener productos farmacéuticos con menores efectos secundarios. La utilización tradicional de plantas medicinales, sumada a los avances en tecnología, ha permitido generar diversos productos de calidad uniforme, eficaces y seguros.²³

La preocupación de fabricantes y consumidores en general sobre los temas de calidad se ha incrementado. Especialmente a partir de los años 80 cuando se ha desarrollado la concienciación de la calidad a todos los niveles de la sociedad, de manera que hoy en día la calidad de los productos farmacéuticos y alimenticios es, más que un deseo, una necesidad. Actualmente un indicador de producto bueno e inocuo es la incorporación de sistemas de calidad contrastados, que sean capaces de generar confianza en el consumidor.²³

Controlar la calidad es el proceso a través del cual podemos medir la calidad real, compararla con las normas existentes y actuar sobre las diferencias. El primer paso importante para la planificación de la calidad, es la redacción de las especificaciones de calidad para cada producto.²³

Calidad Microbiológica

En la producción de fitofármacos se aplica el concepto de control de calidad integral que corresponde al conjunto de procedimientos que se deben considerar en su fabricación, que incluye desde la recepción de la materia prima hasta el material de envase, siguiendo el flujo de fabricación de acuerdo a lo establecido por las normas de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Es así como el control de calidad se debe aplicar en las etapas de recepción de materias primas y envases, manufactura, en producto intermedio, en producto terminado, en almacenamiento y distribución.²³

El control microbiológico en los fitofármacos refleja la calidad de los productos naturales ya que para considerarse apta para el consumo humano debe cumplir con las especificaciones microbiológicas establecidas, de ahí la importancia que estos productos lleguen a la población con un control adecuado que garantice su inocuidad.²³

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

- ✓ Por transferencia de la carga microbiana de la materia prima.
- ✓ Por transferencia de la carga microbiana de los equipos empleados en el proceso de manufactura.
- ✓ Por contacto entre el producto terminado y sus contenedores.
- ✓ Por las condiciones de almacenamiento.²³

Contaminación microbiana por la materia prima:

Los insumos que provienen de origen vegetal son recolectados en el campo, por lo que suelen presentar alta contaminación de microorganismos, los propios de la planta y del suelo, y los del medio ambiente en que se desarrollan: polvo, insectos, hongos, materias fecales de animales, pesticidas, también el empleo de agua no apta microbiológicamente o contaminada con metales pesados como Pb, Mn, Ni, Cr, etc., componen la fuente de contaminación de las mismas.²³

Como dicho material vegetal constituye un sustrato apropiado y muchos de los microorganismos presentes son capaces de sobrevivir a los procesos de secado utilizados, resulta que de forma general su recuento microbiano es elevado, compuestos en un alto porcentaje por bacterias mesófilas aerobias, entre los que destacan las formadoras de esporas, lo que explica su supervivencia a pesar del proceso de secado.²³

Contaminación microbiana por el equipo:

Los equipos usados deben ser sometidos a una sanitización rigurosa para poder erradicar la presencia de cualquier tipo de microorganismo, esta contaminación se puede deber a

encapsuladoras, tableteadoras, tanques que se usan en los diversos procesos de manufactura.²³

Contaminación microbiana por el envase:

En el proceso de envasado es necesario asegurarse que los envases no presenten carga microbiana, aún cuando el proceso de manufactura se haya realizado de forma aséptica, un envase contaminado es una gran fuente de contaminación. Por lo que es necesario someter a controles microbiológicos todo material dispuesto a ser usado para el envasado de los productos.²³

Contaminación microbiana por las condiciones de almacenamiento:

El producto terminado debe almacenarse en condiciones óptimas de temperatura y humedad controlada.²³

Control microbiológico de Productos Farmacéuticos no Estériles:

Los productos no estériles son susceptibles de contaminarse con microorganismos tales como bacterias, mohos y levaduras durante el proceso de manufactura: pesada, fabricación, llenado, almacenamiento, así como durante su uso. La contaminación de los productos farmacéuticos, puede tener el potencial de reducir o inactivar la actividad terapéutica del principio activo y por ende representar un riesgo para la salud del paciente; adicionalmente la presencia de estos microorganismos dependiendo de su patogenicidad puede ocasionar infecciones o enfermedades que afecten al paciente o consumidor.²⁴

Por otra parte, el deterioro microbiano podría conllevar a cambios en las características físicas y químicas que conducirían a que el producto deteriorado no sea apto para ser usado, afectando con ello la imagen del laboratorio productor.²⁴

Son aplicables los métodos de inoculación directa en placa o tubo. El producto no debe de ser portador de gérmenes infecto contagiosos. El recuento microbiano o fúngico no deberá

exceder los límites recomendados por la Organización Mundial de la Salud para productos medicinales herbales de uso oral.²⁴

Respecto a la calidad microbiológica, la OMS establece los límites permitidos para formas orales.²³

Tabla N° 1. Límites microbiológicos recomendados para formas orales por la Organización Mundial de la Salud²³

Agente Biológico	Requisito OMS de Formas Orales
Bacteria Aeróbicas	No más de 10,000 ufc por 1 g o mL
Hongos	No más de 100 ufc por 1 g o mL
Enterobacterias y algunas otras bacterias Gram negativas	No más de 100 ufc por 1 g ó mL
<i>Salmonella sp.</i>	Ausencia en 10 g ó 10mL
<i>E. coli</i>	Ausencia en 1 g ó 1 mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia en 1 g ó 1mL
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausencia en 1 g ó 1mL

Fuente: Organización Mundial de la Salud

Ensayo de Límite Microbiano.

El ensayo de límite microbiano se entiende tanto como un atributo de buenas prácticas de manufactura, como de aseguramiento de calidad. Los criterios de aceptación deben estar basados en la naturaleza del producto, el método de manufactura y el uso. Todos los productos farmacéuticos naturales o de origen vegetal, deben declarar este ensayo en sus especificaciones.¹⁹

Se deberá incluir su determinación en todas las formas farmacéuticas sólidas y aerosoles, con al menos una determinación anual.¹⁹

Los Criterios de aceptación deben constar con un recuento total de microorganismos aerobios, hongos y levaduras. También deben contemplarse la ausencia de patógenos, al

menos de *Escherichia Coli* y *Salmonella sp*, para productos de uso oral y *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* si son para uso tópico.¹⁹

Tabla N° 2. Especificaciones para determinación de Límites microbianos²⁰
Expresados en UFC/g o cm³

Producto Natural	Recuento Total de Aerobios Viables	Recuento Total de Hongos y Levaduras	Recuento Total de Enterobacterias
Preparaciones de administración oral	$\leq 10^4$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
Productos terminados para preparación de tisanas	$\leq 10^7$	$\leq 10^5$	$\leq 10^2$
Preparaciones de administración tópica	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^1$

Tabla tomada de Reglamento técnico centro americanos 20

Tabla N° 3. Especificaciones para determinación de Microorganismos patógenos

Producto Natural	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Salmonella sp.</i>
Preparaciones de administración oral	Ausente	Ausente	$\leq 10^2$	Ausente
Productos terminados para preparación de tisanas	Ausente	Ausente(1)	$\leq 10^2$	Ausente
Preparaciones de administración tópica	Ausente	$\leq 10^1$	Ausente	$\leq 10^1$

Tabla tomada de Reglamento técnico centro americanos 20

Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM):

Las Bacterias aerobias se definen como un grupo heterogéneo de bacterias capaces de crecer entre 15°C y 45°C, con un rango óptimo de 35°C. La presencia de este tipo de microorganismos refleja la calidad sanitaria de los productos analizados indicando, además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipuladas.

Mediante el recuento de microorganismos aerobios mesófilas se estima la microbiota, pero sin identificar tipos de microorganismos.²¹

Tiene un valor limitado como indicador de la presencia de patógenos o sus toxinas. Un recuento total de aerobios mesófilos bajo, no asegura que un producto esté excepto de patógenos o sus toxinas; tampoco un recuento total alto significa, inevitablemente, presencia de microbiota patógena.²¹

Procedimiento para Determinación de Bacterias Aerobias Mesófilas²²

Método en Placa

- ✓ Se pesa asépticamente 10 ml de muestra previamente obtenidas en recipientes estériles.
- ✓ Se agrega en solución amortiguadora de Fosfato pH 7.3±2 para obtener 100 mL. Se diluye aún más si fuera necesario en diluciones decimales de 10.2, y 10.3, para que 1 mL permita obtener entre 30 y 300 colonias.
- ✓ Seguidamente se pipetea 1 mL de la dilución final y se transfiere a dos placas Petri estériles; se agrega inmediatamente a cada placa de 15 a 20 mL del Medio Agar Digerido de Caseína y Soya, previamente fundido y enfriado a una temperatura aproximada de 45°C.
- ✓ Se cubren las placas de petri
- ✓ Se mezcla la muestra inclinando ligeramente o rotando suavemente las placas sobre una superficie plana (técnica del ocho) y se deja que el contenido se solidifique a temperatura ambiente.
- ✓ Se invierten las placas y se incuban durante 48 a 72 h a una temperatura de 30 a 35°C.
- ✓ Una vez finalizada la incubación, se examinaron las placas para verificar crecimiento de microorganismos.
- ✓ Se cuenta el número de colonias y se expresa el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por gr o por mL (UFC/g o UFC/mL) de muestra.

- ✓ En caso de no recuperarse las colonias microbianas de las placas que representan la dilución inicial (1:10) de la muestra, expresar los resultados como “menor de 10 microorganismos por g o por mL de muestra.”²²

Cálculos

Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g o por mL (UFC/g o UFC/mL) de muestra.²²

Criterio de Aceptación

Para el recuento se aceptan las cajas que contengan de 30-300 colonias usando la cuenta colonias de Quebec.²²

Hongos y Levaduras:

En el campo de la microbiología industrial se estudia la acción nociva de los hongos en los alimentos y productos manufacturados, como el empleo de estos organismos en fermentaciones industriales en el campo de la biotecnología. Pertenece a grupos taxonómicos muy diversos, aunque se pueden observar a simple vista, estos producen estructuras diminutas, reproductoras y vegetativas, que no es posible estudiar sin la ayuda del microscopio. Comúnmente se le da el nombre de moho a ciertos hongos multicelulares filamentosos, dotados de un micelio verdadero y cuyo crecimiento en los alimentos se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado. Por esta razón no es seguro establecer límites entre los hongos y ciertos organismos productores de esporas y de micelio de las levaduras.²¹

Las levaduras son hongos que crecen generalmente en forma de agregados sueltos de células independientes, que pueden ser globosas, ovoides, piriformes, alargadas o casi cilíndricas. En algunos casos forman cadenas de células alargadas adheridas de modo suelto, semejante a un micelio, por lo que se denomina pseudomicelio. Algunas especies forman breves extensiones de verdadero micelio, con frecuencia ramificado. De acuerdo

con lo expuesto, según se ha comentado, no existe límite de separación definido entre las levaduras y otros hongos que forman un micelio típico.²¹

Las levaduras cuando crecen sobre medios sólidos, forman colonias de aspecto característico que recuerda a las colonias bacterianas. En casi todas las especies de interés industrial, la manera de reproducción vegetativa es por gemación. Muchas de ellas presentan reproducción sexual por medio de ascosporas, a diferencia de los hongos, las levaduras no pueden identificarse solamente sus caracteres morfológicos; se precisa la ayuda de pruebas bioquímicas para la identificación específica.²¹

Procedimiento de Hongos y Levaduras.²²

Método en placa.

- ✓ Se pesa asépticamente 10 ml de muestra previamente obtenida en recipientes estériles.
- ✓ Suspender en solución amortiguadora de Fosfato pH 5.6 ± 0.2 para obtener 100 mL. Diluir aun más, para que 1 mL permita obtener entre 30 y 300 colonias.²²
- ✓ Se pipetea 1 mL de la dilución final y transferir a dos placas de petri estériles; se le agrega inmediatamente a cada placa de 15 a 20 mL de Medio Agar Papa Dextrosa o Medio Agar Sabouraud, previamente fundido y enfriado a una temperatura aproximada de 45°C .²²
- ✓ Cubrir las placas de Petri ²²
- ✓ Mezclar la muestra, inclinando ligeramente o rotando suavemente las placas y dejamos que el contenido se solidifique a temperatura ambiente.²²
- ✓ Invertir las placas de petri e incubar durante 5 a 7 días a una temperatura de 20° a 25°C .²²
- ✓ Una vez finalizada la incubación, se examinan las placas para verificar crecimiento de microorganismos.²²
- ✓ Se cuenta el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por gr o por mL de muestra.²²

- ✓ En caso de no recuperarse colonias microbianas de las placas que representan la dilución inicial (1:10) de la muestra, expresar los resultados como “menor de 10 microorganismos por gr o por mL de muestra”.²²

Cálculos.

No aplica²²

Microorganismos indicadores.

Los microorganismos indicadores son aquellas especies cuya presencia indica que los medicamentos estuvieron expuestos a condiciones que pudieron determinar la llegada a los mismos, de microorganismos peligrosos y permitir la proliferación de especies patógenas o toxigénicas.²²

La finalidad por la que se usan los microorganismos indicadores como reveladoras de prácticas de higiene inadecuadas es precisamente para poner de manifiesto determinadas condiciones de tratamiento o manipulación de los medicamentos que suponen un peligro potencial.²²

Los microorganismos de este género más comunes son los siguientes:

Escherichia Coli: Este microorganismo pertenece a la familia de las enterobacteriaceae o bacterias entéricas que también están conformada por otra serie de bacterias como la *Salmonella*, *Klibsiella*, *Yersinia*, *Shigela*, quienes hacen parte de las bacterias más importantes desde el punto de vista médico.²¹

Dentro de las características principales de *Escherichia Coli* se encuentra que es un microorganismo aerobio facultativo, es un Gram negativo y vive en el tracto intestinal de animales sanos como enfermos. Esta bacteria es oxidasa negativa y fermenta la glucosa produciendo ácido y gas. Fisiológicamente es muy versátil y se adapta muy bien a sus hábitats característico; el tipo nativo *Escherichia coli* no presenta limitantes en cuanto a

factores de crecimiento y metabólicamente pueden transformar la glucosa en cualquiera de los componentes necesarios para su crecimiento. En condiciones anaerobias, se desarrolla por medio de fermentación. También puede desarrollarse por medio de la respiración anaerobia utilizando iones nitrito, como aceptores finales de electrones.²¹

Escherichia coli puede responder a señales ambientales pH, temperaturas, osmolalidad, etc. Por ejemplo, puede detectar la presencia o ausencia de productos químicos y gases en su entorno y dirigirse hacia ellos o lejos de ellos o puede detener su movimiento y generar fimbrias para adherirse a un receptor específico.²¹

Esta bacteria es un habitante permanente del tracto intestinal humano y es el organismo facultativo predominante ahí; sin embargo representa una proporción muy pequeña del contenido bacteriano total. La cantidad de bacterias en el intestino excede en número al *Escherichia coli* por al menos 20:1. La presencia regular de *Escherichia coli* en el intestino y heces humanas ha llevado a buscar la bacteria en la naturaleza como indicador de contaminación fecal y contaminación acuática. Esto significa que la presencia de esta bacteria indica una contaminación con heces humanas.²¹ Por lo tanto, su presencia en los medicamentos, es un indicador de contaminación directa o indirecta de origen fecal, lo que implica la presencia simultánea de bacterias patógenas como *Salmonella typhi*, *Shigella spp*, *Vibrios spp* y *Entamoeba spp* (estas últimas no se analizan comúnmente en el laboratorio a los productos farmacéuticos no estériles).²²

Los coliformes son buenos indicadores de una limpieza y desinfección no adecuada o de una industrialización o tratamiento de medicamentos incorrectos, favoreciendo la multiplicación de microorganismos patógenos.²²

Determinación de Ausencia de *Escherichia coli*.

Procedimiento.

- ✓ Pesar asépticamente 10 ml de muestra previamente contenida en recipientes estériles y suspenderla en Medio Líquido de Lactosa para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 24 h.²²

- ✓ Examinar el medio para verificar el crecimiento, el cual no debe de presentar turbidez. Si no presenta turbidez, continuar con la prueba. ²²
- ✓ Mezclar el medio agitando suavemente (conservar el contenido del Medio Líquido de Lactosa). ²²
- ✓ Con la ayuda de un asa de inoculación, realizar estrías con una porción del Medio Líquido de Lactosa sobre la superficie del Medio Agar McConkey. ²²
- ✓ Cubrir las placas de Petri, invertir e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h. ²²
- ✓ Al examinar las placas, si no presentan colonias conformes a la descripción dada en la tabla, la muestra cumple con los requerimientos para la prueba de ausencia de *Escherichia coli*, de lo contrario proceder con una identificación adicional. ²²

Tabla N° 4. Características Morfológicas de *Escherichia coli* en Medio Agar McConkey.

Tinción Gram	Morfología Característica de las Colonias
Bacilos negativos (cocos-bacilos)	De color rojo ladrillo, pueden tener una zona de bilis precipitada alrededor

Fuente: propuesta de un manual de procedimientos microbiológicos para pruebas de límites microbianos en productos farmacéuticos no estériles.

- ✓ Transferir las colonias sospechosas representativas individualmente con un asa de inoculación a la superficie de Medio Agar Levine con Eosina-Azul de metileno (EMB) colocadas en cajas de petri. ²²

NOTA: Si debe transferirse un número grande de colonias, dividir la superficie de cada placa en cuadrantes y sembrar cada uno de ellos con colonia diferente. ²²

- ✓ Cubrir las placas, invertimos e incubamos a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h. ²²
- ✓ Examinar las placas, las colonias no deben exhibir un brillo metálico característico bajo luz reflejada ni presentar una apariencia negro azulada bajo luz transmitida, si lo presentan la muestra no cumple con la prueba de ausencia de *Escherichia coli*. ²²

Cálculos

No aplica.²²

Salmonella sp:

Es uno de los microorganismos que sufre injuria bacteriana, por lo que la búsqueda de este es dispendiosa. Es causante de la salmonelosis, la primera causa de enfermedad transmitida por alimentos en Estados Unidos. Para su búsqueda en alimentos se puede utilizar métodos tradicionales o rápidos (tipos ELISA); en la legislación colombiana el método a utilizar es el tradicional que incluye 5 pasos que son: ²¹

- ✓ Pre enriquecimiento no selectivo
- ✓ Enriquecimiento selectivo
- ✓ Aislamiento en medios selectivos
- ✓ Identificación bioquímica
- ✓ Pruebas antigénicas.²¹

Determinación de Ausencia *Salmonella spp*²²

Procedimiento

- ✓ Se pesa asépticamente 10 ml de muestra previamente obtenida en recipientes estériles.²²
- ✓ Suspender en Medio Líquido caldo Lactosa para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.²²
- ✓ Examinar el medio para verificar el crecimiento,²²
- ✓ Si hubiera crecimiento, mezclar agitando suavemente. (Conservar el contenido del Medio Líquido de Lactosa)²²

Prueba para *Salmonella spp.*

- ✓ Pipetear porciones de 1 mL del Medio Líquido de Lactosa y transferir a tubos de ensayo que contengan 10 mL de Medio Líquido de Selenito-Cistina y Medio Líquido de Tetracionato, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 12 a 24h.²²

- ✓ Luego con la ayuda de un asa de inoculación, realizar estrías de los Medios Agar Selenito-Cistina y Tetracionato sobre la superficie de los Medio Agar Verde Brillante, Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato y del Medio Agar Sulfito de Bismuto contenido en placas petri.²²
- ✓ Tapar las placas, invertir e incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h.²²
- ✓ Al examinar las placas, si no presentan colonias conformes a la descripción dada en la tabla (ver tabla N^o 5), la muestra cumple con los requerimientos para la prueba de ausencia del género *Salmonella*, de lo contrario proceder con una identificación adicional.²²

Tabla N^o 5. Características Morfológicas de *Salmonella spp* en Medio Agar Selectivo.

Medio Selectivo	Morfología Característica de las Colonias
Medio Agar Verde Brillante	Pequeñas, transparentes, incoloras o de color rosado a blanco opaco (frecuentemente rodeadas por una zona de color rosado a rojo).
Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato	De color rojo, con o sin centros negros
Medio agar con Sulfito de Bismuto	De color negro o verde

Fuente: propuesta de un manual de procedimientos microbiológicos para pruebas de límites microbianos en productos farmacéuticos no estériles.

- ✓ Transferir colonias sospechosas representativas individualmente con un asa de inoculación a un tubo inclinado de Medio Agar Triple Azúcar-Hierro (TSI), estriando primero la superficie inclinada y luego clavar bien el alambre por debajo de la superficie.²²
- ✓ Incubar a una temperatura de 30 a 35 °C durante 12 a 24 h.²²
- ✓ Examinar²².

Cálculos

No aplica.²²

Staphylococcus aureus:

Es una especie bacteriana integrada por formas cocáceas, se dividen en más de un plano por lo que se agrupan irregularmente en racimos. Son inmóviles y carecen de poros. Es una especie muy sensible a la acción del calor y de los desinfectantes. En general la presencia de un número elevado de esta bacteria en un alimento refleja su mala manipulación. Puede ocurrir que no se detecte en un alimento y que el número de microorganismos sea pequeño, sin embargo existe la posibilidad de la presencia de la toxina que por su resistencia permanece en el alimento.²¹

Determinación de ausencia de *Staphylococcus aureus*²²

Procedimiento

- ✓ Se pesa asépticamente 10 ml de muestra previamente obtenidas en recipientes estériles y se suspende en Medio Líquido Digerido de Caseína y Soya, para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.²²
- ✓ Se examina el medio para verificar el crecimiento y, si hubiera crecimiento utilizar un asa de inoculación para realizar estrías con una porción del medio en la superficie del Medio Agar Vogel-Johnson (o Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar Manitol Salado), cada uno de ellos colocado en placas petri.²²
- ✓ Cubrir las placas, invertirlas e incubar a una temperatura de 30 a 35°C por un tiempo de 24 h.²²
- ✓ Examinar las placas y comparar las colonias con las características enumeradas en la tabla (ver Tabla N^o 6).²²

Tabla N^o 6. Características Morfológicas de *Staphylococcus aureus* en Medio Agar Selectivo.

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

Fuente: propuesta de un manual de procedimientos microbiológicos para pruebas de límites microbianos en productos farmacéuticos no estériles.

Prueba de coagulasa para (*Staphylococcus aureus*)

- ✓ Con la ayuda de un asa de inoculación, transferimos colonias sospechosas de la superficie del Medio Agar Vogel-Johnson (o Medio Agar Baird-Parker o Medio Agar Manitol Salado) a tubos individuales que contenían cada uno 0.5 mL de plasma de mamífero preferiblemente de conejo o caballo, con o sin aditivos.²²
- ✓ Incubamos en un baño de agua a 37°C, examinando los tubos a las 3 h y sucesivamente a intervalos adecuados hasta las 24 h.²²
- ✓ Realizamos las pruebas de los controles negativos y positivos con las muestras desconocidas.²²
- ✓ No debe de formar ningún grado de coagulación.²²

Cálculos

No aplica.²²

Criterio de aceptación.

Si los tubos con plasma no presentan ningún grado de coagulación la muestra cumple con requisitos para confirmar la ausencia de *Staphylococcus aureus*²²

Pseudomona aeruginosa:

Es un bacilo Gram negativo, aerobio en forma de bastón se presenta en pares o en cadenas y no produce esporas. Es móvil, con flagelos monótricos polares, produce pigmentos fluorescentes difusibles, la pio verdina y un pigmento soluble la piocianina. Este último es producido por la mitad de las cepas clínicas lo que le da el nombre aeruginosa.²¹

Es nutricionalmente versátil, no requiere de factores de crecimiento orgánicos, es aerobio obligado, excepto en presencia de nitratos. Crece en forma óptima a 37 °C y 42 °C, oxidasa glucosa y xilosa pero no maltosa, es positivo para indo fenol oxidasa y no produce H₂S. Tiene olor dulzón en cultivo que es una característica para confirmar la presencia de *Pseudomona. Aeruginosa*.²¹

Es un microorganismo patógeno oportunista que produce compromiso infeccioso en pacientes con alteraciones en barreras mucocutáneas, con alteraciones severas del mecanismo inmune. Su Capacidad patogénica se debe a la presencia de una serie de factores de virulencia, posee resistencia natural a una serie de antimicrobianos.²¹

Epidemiología:

- ✓ Tiene distribución mundial, es cosmopolita.
- ✓ Se aísla de suelos, aguas, plantas, animales, incluyendo al hombre, algunas veces patógeno para animales y vegetales.
- ✓ Predilección por un medio ambiente húmedo, esto está evidente ya que su ambiente natural está relacionado con agua y suelo.
- ✓ Colonización humana ocurre en sitios húmedos como pirineo, axilas y oídos, la humedad es un factor crítico en los hospitales, reservorios, equipos de ventilación mecánica, soluciones de limpieza, medicamentos y desinfectantes etc.
- ✓ Enfermedad humana extrahospitalaria también se asocia a ambientes húmedos: piscinas, soluciones para lentes de contactos etc.
- ✓ Pacientes con quemaduras en piel.²¹

Determinación de ausencia de *Pseudomona aeruginosa*.²²

Procedimiento.

- ✓ Pesar asépticamente 10 ml de muestra previamente obtenidas en recipientes estériles y suspender en Medio Líquido Digerido de Caseína y Soya, para obtener 100 mL, mezclar e incubar a una temperatura de 30 a 35°C durante 24 h.²²
- ✓ Examinar el medio para verificar el crecimiento, utilizar un asa de inoculación para realizar estrías con una porción del medio Líquido Digerido de Caseína y Soya en la superficie del Medio Agar Cetrimide, cada uno de ellos colocado en placas petri.²²
- ✓ Cubrir las placas, invertir e incubar a una temperatura de 30 a 35°C por un tiempo de 24 h.²²
- ✓ Examinar las placas y comparar las colonias con las características enumeradas en la tabla 7.²²

Tabla N° 7. Características Morfológicas de *Pseudomonas aeruginosa* en Medio Agar Selectivo y de Diagnóstico.

Medio Selectivo	Morfología Característica de las Colonias	Fluorescencia en luz UV	Prueba de Oxidasa	Tinción Gram
Agar Cetrimida	Generalmente verdoso	Verdoso	Positivo	Bacilos negativos
Agar <i>Pseudomonas</i> para la detección de fluorescencia	Generalmente incoloro a amarillo	Amarillento	Positivo	Bacilos negativos
Agar <i>Pseudomonas</i> para la detección de Piocianina	Generalmente verdoso	Azul	Positivo	Bacilos negativos

Fuente: propuesta de un manual de procedimientos microbiológicos para pruebas de límites microbianos en productos farmacéuticos no estériles.

Prueba de oxidasa y de pigmentos (*Pseudomona aeruginosa*)

- ✓ Con la ayuda de un asa de inoculación, transferir las colonias sospechosas representativas de la superficie del Medio Agar Cetrimide, sobre Agar *Pseudomona* para las detecciones de fluorescencia y del Medio *Pseudomona* para la detección de Piocianina contenidas en las cajas de petri.²²

NOTA: Debe de retransferirse un número grande de colonias sospechosas.²²

- ✓ Dividir la superficie de cada placa en cuadrantes e inocular cada uno con una colonia diferente.²²
- ✓ Cubrir las placas, invertir el medio inoculado e incubar a una temperatura de 35° ±2 °C durante no menos de tres días.²²
- ✓ Examinar la superficie estriada bajo luz Ultra Violeta, para determinar si hay colonias presentes con las características mencionadas en la tabla N° 7.²²

Prueba de oxidasa.

- ✓ Confirmar si el crecimiento de uno o más medios correspondió a *Pseudomona aeruginosa* por medio de la prueba de oxidasa.²²

- ✓ Una vez que haya tenido lugar el crecimiento de *Pseudomona aeruginosa*, colocar las colonias a tiras o discos de papel filtro que se impregnaron previamente con Diclorohidrato de N,N-Dimetil-p-Fenilendiamina.²²
- ✓ No debe de aparecer un color rosado que se torna a violeta.²²

La presencia de *Pseudomona aeruginosa* se puede confirmar mediante otros medios adecuados y pruebas bioquímicas, si fuera necesario.²²

Cálculos

No aplica²²

Bioensayos

Los Bioensayos son experimentos que se realizan bajo condiciones controladas de laboratorio con el propósito de evaluar cualitativa y cuantitativamente el efecto que los agentes xenobióticos producen sobre organismos vegetales o animales cuidadosamente seleccionados. Otros autores conceptualizan el ensayo biológico como herramienta de diagnóstico para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas.³

La Toxicidad es la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismo o la biocenosis, y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico, y su relación con el ciclo de vida del organismo; las pruebas podrán ser de tipo agudo o crónico.³

Toxicidad aguda: efecto adverso (letal o subletal) inducido sobre los organismos de ensayos en prueba durante un periodo de exposición del material de ensayo, usualmente de pocos días. Los ensayos de toxicidad aguda son pruebas donde la exposición se realiza en

un período corto, por lo general el período corto es de 24 a 48 horas, no obstante, puede variar dependiendo de la especie evaluada.³

Toxicidad crónica: efectos tóxicos a largo plazo relacionados con cambios en el metabolismo, crecimiento o capacidad de supervivencia. Los ensayos de toxicidad crónica son pruebas que se realizan durante un periodo largo, por un tiempo en el que la exposición es considerada continua o repetida. Este tipo de bioensayo se lleva a cabo especialmente para determinar la dosis máxima que no presenta efectos tóxicos fuertes a exposiciones constantes y para reconocer los mecanismos de toxicidad acumulativos, que complementan o contrastan, con los observados para ensayos de toxicidad aguda.³

Ensayos multiespecies: como su nombre lo indica son pruebas que incluyen más de una especie, realizadas con el fin de evaluar las alteraciones producidas por interacciones entre organismos y por la influencia del medio ambiente. Acorde a la cantidad de variables incluidas dentro del ensayo estos se pueden clasificar, tal como los describe en: microcosmos, mesocosmos y estudios en campo³

Los Bioensayos de toxicidad son una herramienta intensamente utilizada en países desarrollados, con el objeto de evaluar en forma efectiva y eficiente los efectos tóxicos agudos y crónicos de la contaminación en los organismos vivos. En la práctica, esta técnica cuantifica la relación concentración-efecto de compuestos químicos conocidos o mezclas complejas, por medio de respuestas biológicas medidas bajo condiciones controladas y estandarizadas.³

De manera general, los ensayos, también llamados pruebas de toxicidad, pueden ser definidos de acuerdo con:

- ✓ Su duración: corto, mediano o largo plazo.³
- ✓ El método utilizado para incorporar la muestra al sistema de ensayo: estático, con renovación, de flujo continuo.³
- ✓ El propósito para el cual son utilizados: control de calidad de vertidos, evaluación de compuestos específicos, toxicidad relativa, sensibilidad relativa, etcétera.³

Ensayo de toxicidad *Allium cepa* L.¹

La cebolla es una especie bianual cultivada como anual. El color del bulbo está dado por las catáfilas de protección y pueden ser: blanco, cobrizo, rojo, púrpura o marrón.¹

El bulbo está formado por:

- ✓ Catáfilas de protección membranosas
- ✓ Catáfilas carnosas
- ✓ Se puede ubicar alguna yema axilar cuyas catáfilas acumularon sustancias de reserva
- ✓ Sobre el centro del tallo algunas hojas de follaje no desarrollado.¹

Principio de la prueba

Cuando un bulbo de cebolla se rehidrata se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de las plantas. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemas radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz.¹

El efecto puede determinarse en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de las cebollas expuesta al compuesto tóxico contra la de cebollas no expuestas, luego de un período de 72 horas de prueba. La cuantificación del efecto se realizará estableciendo el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces respecto a la longitud promedio de las raíces del control.¹

Material.

Tubos de ensayo de vidrio de 10 cm de largo 1.5 cm de diámetro (o recipientes de mayor tamaño, dependiendo del tipo de bulbos a utilizar), gradillas o soportes para tubos, bisturí y reglilla para hacer mediciones en cm o mm.¹

Medio de crecimiento *Allium cepa* L

El medio de crecimiento que se utiliza en el desarrollo del ensayo se prepara de acuerdo con lo que se indica en la siguiente tabla: ¹

Tabla N° 8.

Masa de sal para disolver en un litro de agua destilada.	
Reactivo	Cantidad (mg)
Ca(NO ₃) ₂ .4 H ₂ O	236.1
KNO ₃	202
MgSO ₄ . 7H ₂ O	246
KH ₂ PO ₄	136.1
FeEDTA.3 H ₂ O	67.6

Fuente: ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en aguas y suelo experiencia México.

Organismos de prueba

Para la elaboración de las pruebas se deben seleccionar bulbos de *Allium sp.* (Cebolla amarilla) de 1.5 cm de diámetro, seco y sin formación de hojas o raíz. Estos pueden ser obtenidos del mercado local o adquiridos a través de algún proveedor. ¹

Previo al montaje de la prueba los bulbos deben limpiarse eliminando la epidermis seca y removiendo con un bisturí o instrumento punzante los restos de tejido y raíces del área radicular, no se deben dañar las raíces primordiales. Con el fin de eliminar los restos de tejido, es conveniente colocar los bulbos en agua destilada por dos horas y dejar secar. ¹

Almacenamiento de los bulbos de cebolla

Se recomienda adquirir los bulbos en vísperas de la realización de las pruebas, o en su defecto, almacenarlos en un lugar donde se puedan garantizar condiciones secas a una temperatura entre 10 a 20 °C. En algunas regiones, los bulbos pueden mantenerse almacenados hasta por un año, sin embargo en zonas geográficas donde la temperatura y la humedad son altas, el almacenamiento está limitado por pocos días. ¹

Control de calidad del material biológico

Dado que la prueba de cebolla no requiere mantenimiento de un cultivo, el control de calidad debe enfatizarse en la calidad de los lotes de material a utilizar, por esa razón, debe darse especial importancia al almacenamiento del material, así como al control de hongos que pueden afectar la viabilidad de las cebollas y su normal desarrollo. Es por ello que se recomienda disponer de un número de cebollas por lo menos 3 o 4 veces mayor del requerido para las pruebas. Su almacenamiento debe hacerse en un lugar exento de humedad, a una temperatura entre 10 a 20 °C.¹

Control de calidad en las pruebas con *Allium cepa* L.

Un elemento importante en la elaboración de las pruebas es el proceso de pelado de los bulbos, durante este proceso debe evitarse el daño del anillo radicular. Igualmente se debe trabajar con un alto número de réplicas para controlar la variabilidad de las pruebas, se recomienda utilizar 12 réplicas por concentración, con el fin de descartar por lo menos 2 de los valores más extremos. En el caso que exista un bajo desarrollo radicular en más de 2 bulbos de control, se considera que el lote de bulbos tiene problemas, por tanto los resultados no serán válidos.¹

Al igual que en todas las pruebas, se debe establecer la sensibilidad de los bulbos a los compuestos de referencia, se recomienda el empleo de Cu (II) a partir del sulfato de cobre y registrar la sensibilidad mediante una carta de control por lo menos con veinte pruebas. Resultados por encima o por debajo de la sensibilidad establecida son indicativos de problemas con el material biológico utilizado.¹

Procedimiento de la prueba

Preparación de las disoluciones

Generalmente, se sugiere el empleo de una serie de 5 concentraciones, un control negativo y 1 o 2 controles positivos, este último contiene el compuesto de referencia mencionado en el párrafo anterior. Para su preparación se emplea el método de dilución en forma

secuencial aplicando el factor de 0.2 o 0.3. Cuando se lleva a cabo una evaluación exploratoria puede emplearse una serie de diluciones logarítmicas (por ejemplo: 100, 10, 1, 0.1, 0.01) lo cual permitirá establecer el intervalo de concentración conveniente para la determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀).¹

Desarrollo de la prueba

Cuando se trabaja con bulbos de diámetro pequeño, las pruebas se realizan en un tubo de ensayo de 10 cm de longitud por 1.5 cm de ancho, en el caso de bulbos de mayor diámetro pueden utilizarse tubos o recipientes de mayor volumen, dependiendo del tamaño de los mismos, es importante destacar que la profundidad de los recipientes debe ser tal que, al término de la prueba, la elongación máxima no alcance el fondo del recipiente.¹

En la prueba se utilizan 5 concentraciones de la muestra, un control negativo y 1 o 2 controles positivos cada uno con 12 réplicas. El ensayo inicia con el llenado de cada uno de los tubos de cada una de las disoluciones y controles, este llenado debe hacerse hasta el borde del tubo. A continuación se colocan los bulbos limpios sobre la boca del tubo cuidando que la zona radicular quede inmersa en el líquido.¹

Los tubos se colocan en la gradilla, la cual se localiza en la mesa que no presente vibraciones y se mantienen a temperatura ambiente (20 °C) durante un periodo de 72 horas. Debe evitarse la iluminación directa.¹

Dos veces al día durante el periodo de prueba, se debe reponer el volumen perdido por evaporación o absorción. Para reponer este volumen se utiliza la muestra o dilución correspondiente. Se recomienda inclinar el bulbo sin sacar las raíces del tubo, adicionando cuidadosamente el volumen con ayuda de una pipeta pasteur.¹

Tabla N° 9. Condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con *Allium Cepa*.¹

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	20°C ambiente
Calidad de luz	Fluorescente, blanco frio
Iluminación	Indirecta
Recipientes de prueba	Tubos de ensayo de 10cm x 1.5cm de diámetro
Número de réplicas	8
Material biológico	Bulbos aproximadamente de 1.5 cm de diámetro
Condición de los bulbo	Pelar los bulbos y la base, evitar dañar el anillo radicular.
Agua de dilución	Agua de la llave o medio de crecimiento
Número de concentraciones	5
Duración de la prueba	72 horas
Efecto medido	Inhibición del crecimiento de las raíces.
Control negativo	Agua de la llave o medio de crecimiento
Control positivo	Cobre (II) a partir de una solución de CuSO ₄
Resultado final	CL ₅₀

Fuente: ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en aguas y suelo experiencia México.

Expresión de los resultados

Medición

Al término del periodo de exposición se registra la longitud promedio de las raíces, medición que se lleva a cabo con ayuda a una regla común con escala en milímetros, la medición se lleva a cabo colocando la escala en el margen del tubo, se ubica el valor de longitud mínimo y máximo donde incide la mayoría de las raíces y el punto medio se define como el promedio. Se efectúa la estimación de cada tubo y se obtiene el promedio matemático de diez replicas (los dos valores más extremos se descartan). Para obtener el porcentaje de efecto de inhibición se debe realizar la siguiente operación: ¹

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Long. De Control} - \text{Long. de la Muestra}}{\text{Long del control}} * 100$$

Con estos valores se construye una gráfica de concentración en función del porcentaje de inhibición y se calcula la CI_{50} mediante cualquiera de los siguientes métodos: probit, promedios móviles o Sperman y Karber.¹

Ensayo de toxicidad *Lactuca sativa*¹

Principio de la prueba

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 horas de exposición) en el que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo (figura 4.1). Es importante destacar que durante el período de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es de gran importancia para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocotilo constituye indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta.¹

A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sin embargo pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocotilo, dependiendo ello del modo y sitio de acción del compuesto. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocotilo constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar el efecto en la germinación.¹

Este ensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales (lagos, ríos), aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas. A diferencia de otras pruebas en las que se consideran algas o plantas acuáticas sumergidas como organismo de diagnóstico, el bioensayo con semillas permite evaluar la fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbiedad de manera directa y sin necesidad de filtración previa, reduciéndose así las interferencias debidas al pre tratamiento y simplificando el procedimiento de prueba.¹

Si bien la *Lactuca sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, la información generada a partir de esta prueba de toxicidad proporciona datos acerca del posible efecto de los contaminantes en las comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminadas, siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola.¹

Por otra parte, es de fácil y rápida germinación por lo que es posible desarrollar la prueba en pocos días. Este bioensayo de toxicidad ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y compuestos puros, además de la evaluación del efecto fitotóxico de plaguicidas sobre especies no blanco, necesarios para el registro de estos compuestos.¹

En la incorporación de esta prueba en una batería de bioensayos es importante considerar el compromiso entre la sensibilidad de la especie *L. sativa*, el reducido tiempo de exposición de la prueba con semillas, los bajos costos asociados y que no requiere equipamiento sofisticado, en particular en la aplicación a muestras ambientales o en el monitoreo de procesos de detoxificación, saneamiento, control de efluentes o reuso de biosólidos¹

Tabla N°. 10. Materiales, Equipos y Reactivos a utilizarse en la Prueba

Material	Equipo	Reactivos
✓ Cajas Petri de 100 mm de diámetro	Cámara oscura de temperatura controlada (22 ± 2 °C).	Agua dura reconstituida (APHA, 1992).
✓ Matraces aforados de 50 mL		
✓ Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL		
✓ Regla u otro elemento de medición		
✓ Pinzas		
✓ Toallas de papel		
✓ Bolsas plásticas		
✓ Papel de filtro		

Fuente: Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en aguas y suelo experiencia México

Organismos de prueba

En este ensayo se usan semillas de lechuga de la especie *L. sativa*, variedad mantecosa. La obtención de las semillas de lechuga se realiza en semillerías locales, procurando que sean semillas sin curar (sin fungicidas o plaguicidas), con buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula e hipócotilo. Con respecto a la verificación de la viabilidad de las semillas previo a la implementación de la prueba, es recomendable que cada lote nuevo de semillas que se utilice tenga un porcentaje de germinación superior al 90%, sincronización en la germinación y baja variabilidad de la elongación de la radícula e hipócotilo (coeficiente de variación <30%).¹

Es necesario además caracterizar las condiciones de germinación del lote de semillas, evaluando la respuesta frente a la luz (fotoblastismo positivo o negativo: germinación en presencia o ausencia de luz, respectivamente) y la temperatura óptima de germinación.¹

Con el fin de reducir la variabilidad en los resultados, para el caso de semillas no seleccionadas y que presenten gran heterogeneidad en el tamaño, es conveniente realizar una selección previa descartando las fracciones de mayor y menor tamaño y utilizando solamente la fracción más numerosa y de tamaño intermedio. La fracción de menor tamaño puede presentar un alto porcentaje de semillas vanas, mientras que las semillas de mayor tamaño pueden ser más vigorosas, variando la sensibilidad frente a los compuestos tóxicos.¹

Si no es posible obtener lotes de semillas con poder germinativo igual o mayor al 90%, se debe aumentar el número de semillas por caja para obtener un número mínimo de 18 semillas germinadas. Por otra parte, si se desea aumentar la confiabilidad de los resultados, o en caso de contar con semillas que posean una alta variabilidad en la elongación de la radícula de los controles negativos, aún habiéndolas seleccionado de tamaño uniforme, se recomienda aumentar el número de réplicas por tratamiento.¹

Las semillas seleccionadas se almacenan fraccionadas a 4° C, en oscuridad y en ambiente seco. Conservadas en estas condiciones mantienen su vigor al menos durante 2 años. Un indicador de la reducción de la vitalidad y envejecimiento de las semillas es la reducción en el poder germinativo y el aumento en la variabilidad de las medidas de elongación de radícula e hipócotilo en el control negativo. En este caso se recomienda realizar las pruebas de toxicidad utilizando un nuevo lote de semillas.¹

Procedimiento de prueba del Ensayo de toxicidad *Lactuca sativa*.

Preparación de las diluciones

Para realizar una curva dosis- respuesta se recomienda preparar un mínimo de 5 o 6 diluciones de la muestra o compuesto a estudiar de manera que se obtengan valores de toxicidad intermedios entre el 100 y 0%. Para las muestras ambientales se recomienda el uso de un factor de dilución de 0.3 o 0.5 para la preparación de la serie de diferentes concentraciones. El uso de un factor de 0.3 permite evaluar la toxicidad considerando el intervalo entre el 100% y 1% de la muestra realizando 5 diluciones (100, 30, 10, 3 y 1%). Al aplicar un factor de dilución de 0.5, es necesario utilizar mayor número de diluciones para abarcar el mismo intervalo de concentraciones (100, 50, 25, 12, 6, 3 y 1.5%) pero se obtiene mayor precisión en los resultados. Para la preparación de cada dilución se utiliza agua dura reconstituida (es posible el uso de agua mineral dura para consumo humano), realizando el control negativo con el agua de dilución empleada. Para el caso de las muestras cuya toxicidad es desconocida, previo a la realización de la prueba definitiva, se sugiere hacer una prueba exploratoria (ensayo preliminar) utilizando diluciones logarítmicas (100, 10, 1, 0.1, 0.01) que permitan establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 y 0%, necesarios para calcular la CI_{50} .¹

Control de calidad de pruebas

Es importante establecer cuáles son los valores de elongación en el control negativo, así como la sensibilidad de las semillas frente al compuesto tóxico de referencia (control positivo), determinando para cada lote de semillas el valor de CE_{50} . Se realizan cartas control para evaluar el crecimiento en los controles negativos (promedio $\pm 2\sigma$ de la elongación de la radícula) y de la sensibilidad frente al compuesto tóxico de referencia (promedio $\pm 2\sigma$ de la CE_{50} para el Zn (II) preparado a partir disulfato de zinc). Como se mencionó anteriormente, la reducción en el poder germinativo ($< 90\%$) y el aumento en la variabilidad de las medidas de elongación de radícula e hipocotilo en el control negativo a lo largo del tiempo, son indicadores de la reducción de la vitalidad y envejecimiento de las semillas. En este caso se recomienda utilizar un nuevo lote de semillas.¹

Desarrollo de la prueba del Ensayo de toxicidad *Lactuca sativa*

Para llevar a cabo el ensayo de toxicidad de *Lactuca Sativa* se deben realizar los siguientes pasos:

- ✓ Colocar en cada caja Petri un disco de papel de filtro.¹
- ✓ Marcar correctamente cada caja con la dilución correspondiente, así como la fecha y hora de inicio y término del bioensayo.¹
- ✓ Saturar el papel de filtro con 4 o 5 ml de la dilución evitando que se formen bolsas de aire.¹
- ✓ Con la ayuda de una pinza, colocar cuidadosamente 20 semillas, dejando espacio suficiente entre las semillas para permitir la elongación de las raíces.¹
- ✓ Tapar las cápsulas y colocarlas en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad. Dado que algunas variedades de semillas de lechuga requieren oscuridad para que se produzca la germinación (semillas fotoblásticas negativas), las cajas de Petri deben cubrirse de la luz inmediatamente después de colocarlas las semillas en su interior y durante el período de ensayo Incubar por 120 horas (5 días) a una temperatura de 22 ± 2 °C.¹
- ✓ Realizar repeticiones para cada dilución ensayada¹

Tabla N° 11. Condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad aguda con *Lactuca sativa* L.¹

Tipo de ensayo	Estático
Temperatura	20 ± 2 °C
Calidad de luz	Oscuridad
Volumen de la solución de prueba	4 Ml
Agua de dilución	Agua dura reconstituida
Número de semillas por réplica	20
Número de réplicas	3
Duración de la prueba	120 horas
Efecto medido	Inhibición en la elongación de la radícula e Hipocotilo. Inhibición en la germinación.
Resultado final	CE50 o CI 50 o % inhibición
Aceptabilidad de los resultados	Germinación > 90% Control positivo y negativo de acuerdo con los valores admitidos en las cartas de control.
Control positivo	Zn (II) a partir de ZnSO ₄

Fuente: ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en aguas y suelo experiencia México

Medida de los puntos finales de evaluación de la fitotoxicidad

Cada punto final se evalúa comparando el efecto generado en los organismos expuestos a la muestra con respecto a la respuesta en los organismos del control negativo, sujetos a las mismas condiciones de ensayo, excepto por la ausencia de muestra. Terminado el período de exposición (120 horas), se procede a cuantificar el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula y del hipocotilo.¹

Efecto en la germinación

Registrar el número de semillas que germinaron normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula.¹

Efecto en la elongación de la radícula e hipocotilo

Utilizando una regla o papel milimetrado, medir cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocotilo de cada una de las plántulas, correspondientes a cada concentración del compuesto tóxico o dilución de muestra y a los controles. La medida de elongación de la radícula se considera desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocotilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocotilo se considera desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones.¹

Estadios por los que atraviesa la semilla *Lactuca sativa* durante el ensayo de germinación y elongación¹

Antes de retirar las plántulas de las cajas Petri para evaluar el efecto en los puntos finales anteriormente mencionados, es importante realizar una observación detallada del estado general de las mismas y del crecimiento de la radícula sobre el papel de filtro. Informar cualquier indicador de fitotoxicidad o de crecimiento anormal en las plántulas tratadas y en los controles (ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes poco desarrollados, radículas con crecimiento ensortijado, necrosis en los cotiledones, etc.). La necrosis (presencia de tejido muerto) se evidencia como manchas localizadas de coloración parda, blanca o marrón. Al evaluar el efecto en la germinación, consignar además aquellas semillas con germinación anormal (emergencia de cotiledones o cotiledones e hipocotilo solamente, pero sin emergencia de la radícula) o con desarrollo de hongos. Un procedimiento factible de realizar para facilitar la medición de la radícula e hipocotilo, es proceder a congelar las cajas Petri correspondientes a todos los tratamientos y descongelarlas a medida que se van midiendo (no conservar el material luego de ser descongelado). De esta manera las plántulas descongeladas adquieren una consistencia blanda, favoreciendo la medición. Si se procede a evaluar el efecto sobre las plantas descongeladas es importante proceder de igual manera con todas las réplicas de la prueba. Este procedimiento reduce la variabilidad en las medidas, principalmente cuando el crecimiento de las radículas es ensortijado o no es parejo. Por otro lado, antes de congelar el material se debe realizar previamente la observación general de efectos fitotóxicos en las plantas vivas al finalizar el período de exposición.¹

Expresión de resultados

Se realizan los siguientes cálculos:

- ✓ Promedio y desviación estándar de la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas de cada repetición.¹
- ✓ Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocotilo con el promedio de elongación para cada dilución respecto del promedio de elongación del control negativo.¹
- ✓ Porcentaje de inhibición en la germinación.¹
- ✓ Con los datos anteriores, se elabora la gráfica dosis-respuesta, colocando en la ordenada el porcentaje de inhibición y en la abscisa la concentración. Mediante un método gráfico o el uso de programas estadísticos, se calcula la concentración que produce el 50% de inhibición (CI₅₀/CE₅₀) para cada punto final evaluado. Para el caso de muestras en donde la inhibición es inferior al 50%, o para determinar el valor correspondiente al NOEC o LOEC, se realiza el análisis de comparación de medias (Student, Dunnett) para verificar la significancia estadística en el porcentaje de efecto.¹

Interpretación de los resultados

Los efectos cuantificados sobre la elongación de la radícula o del hipocotilo son efectos subletales. La inhibición en la germinación podría considerarse como un efecto letal siempre y cuando podamos corroborar que finalizada la exposición a una muestra las semillas no germinaron por muerte del embrión y que no existe simplemente un retraso en el proceso de germinación, manteniéndose la viabilidad de la semilla. Al evaluar la fitotoxicidad de muestras ambientales complejas o con compuestos volátiles, en algunos casos se ha observado que al finalizar el período de exposición la inhibición en la germinación es elevada, pero si se extiende el período de ensayo, sin renovar la exposición a la muestra, las semillas comienzan a germinar. La vitalidad de las semillas que no han germinado es posible verificarla mediante la prueba de tetrazolium para viabilidad, pudiendo de esta manera asignarle con certeza a la inhibición de la germinación, el valor e importancia de un efecto letal. No obstante esto, la inhibición en la germinación registrada

al finalizar la prueba, se considera fitotoxicidad aunque el efecto en la germinación sea reversible.¹

Otro aspecto a considerar es el mayor desarrollo en la elongación de la radícula o el hipocotilo en algunas muestras con respecto al control. La exaltación en un punto final no debe ser interpretada como un efecto favorable o estimulante. Si bien es posible que muchos compuestos (por ejemplo Cu, Zn) a bajas concentraciones produzcan exaltación por ser micronutrientes vegetales, esta respuesta debe ser evaluada de manera conjunta con los efectos registrados en otras pruebas. En la aplicación de la prueba con semillas a muestras ambientales conjuntamente con otros organismos como parte de una batería, se ha detectado en diferentes ocasiones que la exaltación en la respuesta en el hipocotilo o radícula se corresponde con toxicidad frente a otros ensayos de la batería.¹

Aceptabilidad de los resultados

El ensayo deberá repetirse en caso de que:

- ✓ En el control negativo el porcentaje de germinación sea inferior al 90 % y exista una alta variabilidad en la elongación de la radícula (coeficiente de variación > 30%).¹
- ✓ En el control positivo el porcentaje de germinación sea inferior al 90 % y la variación de la sensibilidad de las semillas se encuentre fuera de lo permitido por las cartas control.¹
- ✓ Existan posibles interferencias en el proceso normal de germinación o desarrollo de las plántulas en los controles.¹
- ✓ Se presente toxicidad del sustrato. Cuando se reemplaza el papel utilizado por otras marcas más económicas o se utiliza papel de filtro cualitativo en planchas, hay que tener en cuenta los posibles efectos tóxicos del papel. Si se ha tenido buenos resultados con una marca o calidad determinada de papel, es conveniente no variar el sustrato de ensayo.¹
- ✓ Se presente suciedad de las cajas Petri. Si no es posible utilizar material desechable, es importante asegurar un enjuague minucioso del material para evitar la presencia de residuos de detergente u otra solución de limpieza.¹

- ✓ Se presente un exceso de agua o de muestra utilizada para embeber el papel, lo que determina una baja disponibilidad de oxígeno necesario para el normal desarrollo del proceso de germinación. El papel de filtro utilizado como sustrato de germinación de las semillas debe estar bien mojado, con sobrante de líquido para evitar la desecación, pero en ningún caso las semillas deben quedar sumergidas.¹
- ✓ Se presente un déficit hídrico durante el período de exposición. Se recomienda envolver las cápsulas con una bolsa plástica para evitar que el papel de filtro de las mismas pierda agua durante el ensayo. Si se está experimentando con compuestos volátiles, no deben colocarse en una misma bolsa, cápsulas que correspondan a diferentes concentraciones de ensayo. También se puede colocar dentro de la cámara de cultivo un recipiente con agua para generar un ambiente húmedo, reduciendo así la evaporación. Hay que tener en cuenta que la pérdida de humedad de las cápsulas genera una concentración del compuesto cuya toxicidad estamos evaluando y, por lo tanto, las conclusiones a las que arribaremos serán erróneas.¹
- ✓ Se produzca una exposición a la luz durante el proceso de inbibición. Inmediatamente después de colocar las semillas sobre el papel filtro, se recomienda tapar y envolver las cajas Petri, cubriéndolas de la luz (para el caso de semillas fotoblásticas negativas).¹
- ✓ Se presente una elevación de la temperatura de ensayo. Las semillas de *L. sativa* expuestas a una temperatura superior (apenas unos grados) a la óptima para la germinación, no germinarán aunque se les coloque posteriormente a temperaturas inferiores (termodormancia o dormancia inducida por la temperatura).¹

Toxicocinética y toxicodinamia del Plomo.

Plomo

- ✓ Metal de apariencia: gris azulado
- ✓ Estado de la materia: Sólido
- ✓ Entalpía de fusión: 4,799 kJ/mol
- ✓ Entalpía de vaporización: 177,7 kJ/mol
- ✓ Punto de fusión (°C): 600,61 K (327,46 °C)

- ✓ Punto de Ebullición (°C): 2022 K (1749 °C)
- ✓ Presión a vapor: $4,21 \times 10^{-7}$ Pa a 600 K
- ✓ Densidad (g/ml): 11,4.⁶
- ✓ Absorción Digestiva: 95% - 99 %⁶
- ✓ Unión a Hemoglobina: 10% Adulto y en niño 1% - 5%⁶
- ✓ vías comunes: Riñones, hígado, hueso, dientes, pelo y vía placentaria.⁶
- ✓ Eliminación: Plombemias en la madre, Orina hijo, Heces, Leche Materna, Sudor.⁶

Algunos compuestos de plomo son transformados a otras formas de plomo por la luz solar, el aire y el agua. Sin embargo, el plomo elemental no puede ser degradado. El Plomo ocurre de forma natural en el ambiente, pero las mayores concentraciones que son encontradas en el ambiente son el resultado de las actividades humanas. El Plomo se acumula en los cuerpos de los organismos acuáticos y organismos del suelo. Estos experimentarán efectos en su salud por envenenamiento por Plomo. Los efectos sobre la salud de los crustáceos puede tener lugar incluso cuando sólo hay pequeñas concentraciones de Plomo presente y con la posibilidad de llegar hasta el hombre a través de la cadena alimenticia plomo en las aguas superficiales, es que provoca perturbaciones en el fitoplancton, que es una fuente importante de producción de oxígeno en los océanos y de alimento para algunos organismos acuáticos de variado tamaño.⁶

Vía inhalatoria: Es la vía de entrada más importante, penetrando por inhalación de vapores, humos y partículas del polvo. El 50% del Plomo depositado en los pulmones se encuentra en sangre circulante tras aproximadamente 50 horas.⁶

Vía Digestiva: Las partículas de polvo de plomo son ingeridas directamente a través de las manos, alimentos, bebidas o cigarrillos contaminados en el ambiente de trabajo. Constituye la segunda vía de entrada, en importancia, de plomo en el organismo.⁶

Vía cutánea: La absorción por esta vía es débil en el caso del plomo inorgánico al contrario que en el del plomo orgánico.⁶

Descripción, composición y actividad farmacológica de las muestras analizadas.

Zingiber officinal.

Clasificación Taxonómica:

Reino: Plantae

Division: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Zingiberoideae

Familia: Zingiberaceae.

Género: Zingiber

Especie: *Z. officinale*

Etimología: el nombre del género *Zingiber* y el nombre común jengibre, proviene del hindú *zingibil* o *zengibil*, nombre común dado a esta planta.²⁵

Nombres comunes en algunos países o idiomas: inwer (Aleman), cheng kiang, pe la yun (chino); cañocoros, jengibre, jengibre (España); gingembre (Francia), ginger (ingles), zenzero (italia), ginger, raíz de jengibre, rizoma de jengibre (países de habla hispana); jengibre, gengivre (portugués).²⁵

Ubicación Geográfica: Originario del Asia tropical, desde China y Japón hasta la India y Malasia. Se cultiva en lugares tropicales; principalmente India, China, Antillas y Nigeria, como condimento y planta medicinal.²⁵

Descripción botánica: Planta herbácea, perenne, rizomatosa, hasta de un metro de altura. Rizoma grueso, carnoso, nudoso, ramificado en un solo plano. Tallos simples. Hojas lanceoladas, oblongas, dispuestas a lo largo del tallo en dos líneas paralelas. Flores sésiles, amarillas y labios purpúreos de los cuales se destaca un labelo trilobulado con manchas de color amarillo –violeta- pardo; las flores están reunidas en espiga densa al extremo del tallo cubierto de brácteas. Fruto seco y valvoso.²⁵

Composición química¹³:

- ✓ Ácidos: Alfolinolenico, Linoleico, Ascórbico, Aspártico, Cáprico, Caprílico, Gadoleico, Glutamínico, Mirístico, Oleico, Oxálico
- ✓ Gingerol (sustancia típica del jengibre, relacionada estructuralmente con la capsaicina y la piperina).
- ✓ Shogaol (solo en jengibre seco, probablemente se produce por modificación del gingerol por efecto de la deshidratación).
- ✓ Fibra
- ✓ Aceites esenciales: Citral, Citronelal, Limoneno, Canfeno, Beta- bisolobeno, Beta- cariofileno, Beta-bisabolo, Alfa-farneseno, Alfa-cadineno, Alfa-cadinol. Beta- felandreno, Beta-pineno, Beta-sesquifelandreno, Gama-eudesmol,
- ✓ Aminoácidos: Arginina, Asparagina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Niacina, Treonina, Triptófano, Tirosina, Valina
- ✓ Minerales: Aluminio, Boro, Cromo, Cobalto, Manganeso, Fósforo, Silicio, Zinc.¹³

Etnomedicina:

El jengibre tiene numerosas propiedades medicinales que se pueden aprovechar para tratar y aliviar de forma natural variadas dolencias. Es una planta primordial en la medicina ayurvédica y en la medicina tradicional china, esta última le otorga las propiedades de reducir el yin, por lo que el jengibre estaría indicado en enfermedades y alteraciones de la salud provocadas por un exceso de yin. En la medicina tradicional china el exceso de yin es provocado o empeorado por el frío, pero también tiene otros beneficios importantes para la salud¹³

Dentro de los síntomas que puede curar o prevenir están las náuseas y vómitos después de una cirugía, los mareos, el dolor menstrual, la artritis y la prevención de las náuseas del embarazo.

Uso Popular actual: se emplea como carminativo, estomacal, calmante, aperitivo, tónico, febrífugo, diaforético, antiemético, antiespasmódico, antifatulento, antiséptico, antitusivo, estimulante circulatorio y relajante de los vasos sanguíneos periféricos.²⁵

Petiveria alliacea L.

Clasificación Taxonómica:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Caryophyllidae*

Orden: *Caryophyllales*

Familia: *Phytolaccaceae*

Género: *Petiveria*L.

Especie: *P.alliacea* L.

Etimología: petiveria por estar dedicado al farmacéutico y botánico inglés, James Petiver (1665-1718) y, *alliacea*, por el aroma aliáceo; a ajo, (*Allium sativus* L.) de la planta.²⁶

Otros nombres populares: Pipí, calauchín, mikura (aymará y quechua), sunikila (quechua) en Argentina; guiñé, erva pipí, raíz de guiñé, guiñé, sacha ajo en Brasil; chanvico en Perú; mapurite en Venezuela; ajillo y zorrillo en Costa Rica; ipasina en Honduras y Nicaragua; apacín en Guatemala; hierba de las gallinitas y zorrillo en México; epasina, hierva de toro en El Salvador; have en Haití; ananuí en Puerto Rico; koujuorouk en República Dominicana; anamú en Panamá y el Caribe; namú en Cuba; guinea henweed en Jamaica. Francés: verveinepuante; inglés: Garlicsentedpetiveria.²⁶

Ubicación Geográfica: Originaria del sur de Estados Unidos de Norteamérica y México; crece, desde la Florida, en toda América Central y desde Colombia hasta la Argentina; en las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán Formosa, Chaco, Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Santa Fé y Buenos Aires. Crece generalmente en lugares húmedos, algo sombríos y zonas ribereñas.²⁶

Descripción Botánica: Subfrútice erecto de 0,40 a 0,70 m. de altura, con olor a ajo. Raíz profunda, fusiforme, leñosa, de hasta 2,5 cm de diámetro, irregularmente ramificada,

cubierta por una corteza amarillenta, lisa, carnosa, fuerte, desagradable y sabor un amargo, un tanto acre. Tallos ramificados, con las ramas viejas rollizas, leñosas, angulosas y los nuevos herbáceos, angulosos, a veces estriados longitudinalmente. Hojas alternas, pecioladas, elíptico lanceoladas, acuminadas en el ápice. Flores, dispuestas en espigas axilares o terminales de 15-40 cm de largo, gráciles, pequeñas, hermafroditas, pétalos 4 a veces de color blanco, blanco-verdoso o rosado claro. Fruto alargado, conservando el perianto en la base.²⁶

Composición química

- ✓ La raíz contiene los compuestos azufrados trisulfuro de hidroxí-5-etil-benzilo
- ✓ Alcaloides alantoina y trans- metil-4-metoxi-prolina
- ✓ Los compuestos lipídicos ácido lignocérico y beta-sitosterol.¹⁶

Etnomedicina:

Se ha demostrado que la decocción de la planta induce la contracción de músculo liso probada en tejido de útero, aorta y fundus de rata y tráquea de conejo. Un extracto acuoso liofilizado ejerció un efecto antimutagénico frente a un sistema de segregación mitótica inducida por mebendazol en *Aspergillus nidulans* D-30.¹⁶

Además se han hecho aplicaciones tópicas contra el reumatismo y la parálisis; se agrega que la raíz es diurética, y se la emplea contra la hidropesía, parálisis y reumatismo articular se recomienda contra la iscúria espasmódica y se le atribuye la acción medicinal al aceite esencial que es la que comunica su olor característico.¹⁸

Otras acciones probadas son la actividad antibiótica del extracto acuoso sobre bacterias Gram (+), Gram (-) y hongos patógenos y la actividad antiinflamatoria en ratas a las que se provocó inflamación con carragenina y granuloma por algodón.¹⁶

Uso Tradicional: se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, analgésicas, inmunoestimulantes y hipoglucémicas.

Passiflora incarnata .

Clasificación Taxonómica:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Caryophyllidae*

Orden: *Caryophyllales*

Familia: *Phytolaccaceae*

Género: *Petiveria*L.

Especie: *P.alliacea* L.

Etimología: nombre genérico que adoptado por Linneo en 1753 y significa "flor de la pasión. Del latín *passio*; pasión, y *flos*: flor ²⁷

Nombres comunes: Pasiflora, pasionaria, granadilla, flor de la pasión, flor de los clavos de cristo, flor de maracuyá, parchita, parcha, barbadina, manzana Iliana. Passionera (catalán). Pasio-Iore (Euskera). Martirio (gallego). Flor da paixao (portugués). Passionflower (inglés). Passiflore (francés).²⁷

Ubicación geográfica: fue descubierta por accidente en Perú a mediados del siglo XVI por los misioneros españoles, pues ya era usada por los incas por sus propiedades sedantes y desinfectantes. Dada su apariencia de corona de espinas, fue una flor muy idealizada religiosamente de ahí su nombre flor de la pasión.²⁷

La pasiflora no es excesivamente longeva (10 años es a menudo su vida máxima). Hay más de 500 especies de este género (*la passifloraincarnata, passifloraedulis, pasiflora vitifolia*,etc). Todas ellas habitan y son cultivadas en Asia y la américa tropical (Perú, Brasil, México, Estados Unidos, y costa caribe). También se cultiva en numerosos jardines de Europa.²⁷

Descripción botánica: Es una planta herbácea, perenne, de la familia de las pasifloras. Rastrera y trepadora, sus tallos cilíndricos y lampiños, son ramosos y leñosos. Llega a alcanzar los 9 metros de longitud, trepando y enredándose de los cuerpos vecinos. Suelen terminar unas especies de zarcillos espirales con lo que consigue asirse a casi cualquier superficie para conseguir ocuparla casi por completo. Las hojas son redondas partidas en 5 gajos o tiras. Las flores son grandes, redondas, planas y de hermoso color azul o liliáceo; aparece individualmente y pueden llegar a medir 10 cm de diámetro.²⁷

Composición química

En general se podría decir que los ingredientes activos de la pasiflora son alcaloides (harmina y harmol) y heterósidos flavónicos.¹⁴

Passicol: de actividad anti fúngica y comparte las características de los compuestos poliacetilénicos.

- ✓ Alcaloide harman indolico
- ✓ Compuestos nitrogenados y tiene alrededor de un 11% de contenido proteico
- ✓ Flavonoides como: vitexina, saponarina, iso-orientina, y orientinaflavonoides libres como pigenina, luteolina, quercetina, y camferol.
- ✓ Ácidos grasos linoleicos, linolénicos , palmíticos oleicos y mirístico
- ✓ Ácidos fórmicos y butíricos ¹⁴

Etnomedicina:

Se ha utilizado para el tratamiento del dolor, insomnio relacionado con neurastenia o histeria. Otras aplicaciones es el tratamiento de desordenes bronquiales como el asma, en forma de cataplasma y o compresa en caso de quemadura o inflamación. Hemorroides, síntomas y signos de climaterio, déficit atencional pediátrico, nerviosismo y excitabilidad en los niños.¹⁴

Uso tradicional: Se emplea en problemas de ansiedad e insomnio por ser excelente sedante nervioso.²⁷

Material y métodos.

Tipo de Estudio: el estudio es experimental, siendo un experimento puro.

Área de Estudio: laboratorio de Farmacognosia y de Microbiología del Departamento de Farmacia Industrial, de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNAN-LEÓN.

Universo de Estudio: Extractos de raíces de plantas medicinales más comercializadas en las Farmacias Herbolarias de la Ciudad de León.

Selección y tamaño de muestra: 3 extractos de plantas medicinales: *Zingiber officinale*, *Passiflora incarnata*, *Petiveria alliacea L.*

Criterios de inclusión:

- ✓ Extractos de Plantas Medicinales a base de raíz: (*Zingiber officinale*, *Passiflora incarnata*, *Petiveria alliacea L.*) que más se comercializan en la ciudad de León
- ✓ Que los extractos sea obtenidos de la raíz de las plantas medicinales.
- ✓ Que los extractos sean obtenidos de una farmacia herbolaria de la Ciudad de León

Criterios de exclusión:

- ✓ Extractos que no sean las anteriores.
- ✓ Extractos de Hojas, Flores y tallos de las plantas.
- ✓ Que no se comercialicen en las farmacias herbolaria de León.

Métodos e instrumentos de recolección de información.

Instrumento: para la recopilación de los datos necesarios en nuestra investigación fue útil llevar a cabo una entrevista no estructurada con la persona encargada de las farmacias herbolarias. Esta se realizó en un ambiente de cordialidad y respeto con el entrevistado en donde se obtuvo información sobre cuáles son los extractos de plantas medicinales obtenidos a base raíz, que más se comercializaban en la ciudad de León-Nicaragua.

Procedimiento para la recolección de la Información:

Para saber exactamente el tipo de producto a utilizar en este estudio, procedimos a visitar las farmacias herbolarias (6) que encontramos en la ciudad de León, Nos presentamos ante el encargado de dichos establecimientos y les realizamos una encuesta no estructurada de tres preguntas. El objetivo de esta encuesta, era conocer cuáles eran los productos (jarabes), que mayormente compraba la población. De los resultados de esta encuesta, compramos los productos para nuestro estudio.

Fuentes de información:

Para la realización de este estudio utilizamos fuentes primarias y fuentes secundarias

Fuente primaria: fue la encuesta no estructurada que se realizó a la persona encargada del establecimiento herbolario.

Fuente secundaria: Bibliografía, necesaria para la realización de este estudio de investigación tales como libros, revistas científicas, y archivos encontrados y revisados en internet.

Variables:

Bioensayo del *Allium cepa* L.

Ensayo de límite Microbiano.

Operacionalización de las Variables:

VARIABLES	CONCEPTO	INDICADOR	VALOR
Bioensayo de toxicidad aguda con Allium Cepa	Estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta, proceso que se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemos radicales puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células impidiendo el crecimiento normal de la raíz, y por tanto su elongación	Crecimiento de raíces. Inhibición del crecimiento de raíces.	% de inhibición
Ensayo de Limite Microbiano	Método Microbiológico que tiene la capacidad de determinar la presencia de microorganismos a través del uso de medios de cultivos: nutritivos, de enriquecimiento, selectivos y/o diferenciales, capaces de permitir su recuperación a partir de materias primas o productos no estériles y/o de evidenciar ciertas características bioquímicas, producto del metabolismo de los diferentes microorganismos a investigar	Presencia o Ausencia de Bacterias Aerobias Mesófilas Presencia o Ausencia de Bacterias Patógenas <i>Salmonella sp.</i> <i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> Presencia o Ausencia de Hongos y Levaduras.	No >100 ufc Ausencia de patógenos No >10ufc

Procesamiento y análisis de la información: una vez realizada la parte experimental se plasmaron los resultados en tablas de Microsoft Excel 2007 donde se obtuvieron los gráficos de cada una de las muestras en estudio. Estos resultados se plasmaron en Microsoft Word 2007.

MATERIALES Y REACTIVOS:

Materiales.	Equipos	Reactivos
<ul style="list-style-type: none">❖ Tubos de ensayo.❖ Gradillas para tubos.❖ Bisturí.❖ Reglilla.❖ Cajas Petri.❖ Matraces forados.❖ Pipetas volumétricas.❖ Pinzas❖ Toallas de papel❖ Erlenmeyer	<ul style="list-style-type: none">❖ Balanza analítica. Modelo Sartorius serie: TE214S❖ Incubadora doble (precisión), modelo 6M.❖ Mechero busner.❖ Contador de colonia (Quebec), modelo 3325.❖ Autoclave (pelton y crane), código 61139❖ Esterilizador. Electric steroclave, modelo 25X.❖ Horno de esterilización (precisión), código 61142	<ul style="list-style-type: none">❖ Cu(SO₄)₂❖ Agua dura reconstituida.❖ Agar nutritivo❖ Caldo Lactosado❖ Caldo Casoy❖ Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.2

Ensayos Microbiológicos:

Procedimiento para la obtención de las Muestras para el ensayo

- ✓ **Obtención de la muestra:** obtuvimos las muestras de las diferentes farmacias herbolarias a las cuales visitamos teniendo un total de quince frascos por cada una de las muestras a analizar.
- ✓ Preparación reactivos y medios de cultivo: (Ver anexo N.13)

Método vertido en placa.

- ✓ Se preparó el pool de la muestra que consistió en tomar 20 ml de cada frasco, para cada muestra hasta lograr un total de 100 ml que se llevaron a un Erlenmeyer.
- ✓ Se tomaron 10 ml del pool que contenía la muestra.
- ✓ Se agregó en solución amortiguadora de Fosfato pH 7.2 para obtener 100 mL (10⁻¹). Se realizaron diluciones decimales sucesivas de 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴ para que 1 mL permita obtener entre 30 y 300 colonias.

- ✓ Se pipeteó 1 mL de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} y se transfirieron a dos placas petri estériles; agregamos inmediatamente a cada placa de 15 a 20 mL de Medio Agar Digerido de Caseina y Soya, previamente fundido y enfriado a una temperatura aproximada de 45°C.
- ✓ Cubrimos las placas de petri
- ✓ Mezclamos la muestra inclinando ligeramente o rotando suavemente las placas sobre una superficie plana (técnica del ocho) y dejamos solidificar el contenido a temperatura ambiente.
- ✓ Invertimos las placas de petri e incubamos durante 72 h a una temperatura de 30 a 35°C.
- ✓ Una vez finalizada la incubación, examinamos las placas para verificar crecimiento de microorganismos.
- ✓ Contamos el número de colonias y expresamos el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g o por mL (UFC/g ó UFC/mL) de muestra.
- ✓ Expresar los resultados como “menor de 10 microorganismos por g ó por mL de muestra, en caso de no observar crecimiento microbiano.

Cálculos

Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g ó por mL (UFC/g ó UFC/mL) de muestra.

Criterio de aceptación

Para el recuento se aceptan las cajas que contengan de 30-300 colonias usando un cuenta colonias de Quebec.

Diagrama de procedimiento (ver anexo 7)

Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras (Método en Placa)²²

Procedimiento

Método vertido en placa.

- ✓ Se tomó asépticamente 10 ml del pool de cada una de las muestra previamente obtenida en recipientes estériles.²²
- ✓ Suspendimos en solución amortiguadora de Fosfato pH 7.2 para obtener 100 mL (10^{-1}). Diluir aun más, con diluciones sucesivas 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} para que 1 mL permita obtener entre 10 y 100 colonias.²²
- ✓ Pipeteamos 1 mL de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} y los transferimos a dos placas de petri estériles; agregar inmediatamente, a cada placa, de 15 a 20 mL de Medio Agar Sabouraud, previamente fundido y enfriado a una temperatura aproximada de 45°C .²²
- ✓ Cubrimos las placas de Petri ²²
- ✓ Mezclamos la muestra, inclinando ligeramente o rotando suavemente las placas y dejamos solidificar el contenido a temperatura ambiente.²²
- ✓ Invertimos las placas de petri e incubamos durante 7 días a una temperatura de 20° a 25°C .²²
- ✓ Una vez finalizada la incubación, examinamos las placas para verificar crecimiento de microorganismos.²²
- ✓ Contamos el número de colonias y expresamos el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g ó por mL de muestra²²
- ✓ Expresar los resultados como “menor de 10 microorganismos por g ó por mL de muestra” en caso de no observar crecimiento de Hongos.²²

Cálculos

No aplica²²

Procedimiento para realización del Bioensayo *Allium Cepa L.*

Obtención de las muestras:

Las tres muestras *Zingiber officinale*, *Passiflora incarnata*, *Petiveria alliacea L.* fueron obtenidas en extractos de las diferentes farmacias herbolarias de la ciudad de León.

Diluciones: De los extractos obtenidos de las farmacias herbolarias se realizaron diluciones a cuatro concentraciones (0.25, 0.5, 0.75, 1) para las tres muestras de (*Zingiber officinale*, *Passiflora incarnata*, *Petiveria alliacea L.*) respectivamente.

Bioensayo de Toxicidad Aguda para la determinación de minerales con *Allium cepa L.*

- ✓ Los cebollines fueron obtenidos en el mercado terminal de buses ubicado en la colonia Primero de Mayo de la ciudad de León.
- ✓ En el laboratorio se procedió a lavarlos, secarlos y pelarlos con ayuda de un bisturí (se cortaron varias cepas hasta obtener bulbos de aproximadamente 1.5cm de diámetro. Cortándose las raíces que están presentes dejando limpio el Primordio central).
- ✓ Se prepararon soluciones de las muestras a concentraciones de: 0.25mg/ml, 0.5mg/ml, 0.75mg/ml y 1mg/ml en balones de 250ml.
- ✓ Se preparó la solución de Sulfato de Cobre II 0.02M, que fue nuestro control positivo, preparándose igual número de diluciones (0.25mg/ml, 0.5mg/ml, 0.75mg/ml y 1mg/ml).
- ✓ En los tubos de ensayos adicionamos 20ml de agua de la llave (control negativo), sulfato de Cobre II (control positivo) y las soluciones de prueba (las tres muestras), realizando 12 réplicas de cada una.
- ✓ Colocamos los bulbos en el borde de los tubos con el fin de que el primordio quedara en contacto con las soluciones correspondientes.
- ✓ Tomando en cuenta las condiciones del ensayo durante el tiempo de prueba se rellenaron los tubos con las soluciones correspondientes ya que los bulbos absorbían dichas soluciones.

- ✓ Tomando en cuenta las condiciones del ensayo, durante el tiempo de la prueba rellenamos los tubos dos veces al día durante 72 horas.
- ✓ Cumplidas las 72 horas medimos la longitud de las raíces una por una, luego calculamos el promedio de las réplicas de cada una de las concentraciones de cada muestra.
- ✓ Por último obtuvimos el porcentaje de inhibición, usando la siguiente fórmula:

$$\% I = \frac{\text{Longitud del control} - \text{longitud de la muestra}}{\text{Longitud del control}} \times 100$$

Resultados y Análisis de Resultados

Es por todos conocidos, que tanto en los países desarrollados como los que están en vías de desarrollo, el uso y la comercialización de fitofármacos y productos naturales con fines medicinales, muestra un crecimiento acelerado en los últimos años, lo que se reconoce en el aumento significativo de la demanda mundial por este tipo de productos.

Es preocupante el hecho de que, en muchos casos, estos productos no cuentan con los estándares mínimos de calidad necesarios para garantizar su seguridad y eficacia, lo que representa un riesgo para la salud de sus consumidores.

Pese a lo anterior, la proliferación de productos de esta naturaleza y de su publicidad, ha sido poco controlada, por lo que es necesario promover e incentivar estudios investigativos de los productos con fines medicinales derivados de plantas para garantizar la calidad y proteger la salud de la población.

Con la finalidad de solucionar un poco esta situación, presentamos los resultados de este estudio:

Cuadro # 1

Resultados de la prueba del límite microbiano.

CUANTITATIVA.				
Microrganismos.	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Especificaciones.
Recuento Total de Bacterias aerobias Mesófilas	4.7×10^3 UFC/ML	3.0×10^3 UFC/ML	3×10^3 UFC/ML	$\leq 10^4$
Recuento Total de Hongos y levaduras.	4.2×10^1 UFC/ML	1.10×10^2 UFC/ML	0 UFC/ML	$\leq 10^2$

La demanda mundial de plantas medicinales y aromáticas se ha incrementado de manera vertiginosa en los últimos años, de ahí el surgimiento de las buenas prácticas fitosanitarias para que la droga tenga calidad terapéutica. La desinfección de las plantas medicinales surge por tanto como una necesidad de proveer insumos terapéuticos microbiológicamente seguros, con los requisitos exigidos para su comercialización, tanto como droga seca o como materia prima para la elaboración de fitofármacos libres de microorganismos patógenos que aseguren su calidad.

Para el recuento de Bacterias Aerobias mesófilas. Se obtuvieron las muestras de las diferentes farmacias herbolarias de la ciudad de León obteniendo un total de 15 frascos por cada muestra, posteriormente nos trasladamos al laboratorio de Microbiología de la UNAN-LEÓN, luego procedimos a realizar el ensayo del límite microbiano, obteniendo en el recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas para la muestras 1, 2, 3 cumple con las especificaciones propuestas en el Reglamento Técnico Centroamericano.

Para el recuento total de hongos y levaduras la muestra 1, 3 cumple con los parámetros establecidos mientras que la muestra 2 no lo cumple.

Cuadro #2

Resultados de la prueba de límite microbiano para microorganismos indicadores.

CUALITATIVA.		
Microrganismos.	Resultados.	Especificaciones.
Staphilococos Aureus.	Ausencia.	Negativo.
Pseudomona Aeruginosa.	Ausencia.	Negativo
Echerichia coli.	Ausencia.	Negativo
Salmonela sp.	Ausencia.	Negativo

Los microorganismos indicadores se han utilizado con varios fines. El principal objetivo de la utilización de bacterias como indicadores de prácticas no sanitarias es revelar defectos de tratamiento que llevan consigo un peligro potencial, peligro que no está necesariamente presente en la muestra particular examinada. Por lo que en nuestro estudio mostramos los siguientes resultados en la prueba microbiológica observándose la ausencia total de microorganismos indicadores, en las muestras obtenidas en las diferentes farmacias herbolarias de la ciudad de León. De acuerdo a los resultados obtenidos las muestras cumplen con los parámetros establecidos en las bibliografías consultadas.

Bioensayo de toxicidad aguda con *Allium Cepa L* mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces de cebolla

Cuadro# 3

En este estudio se evaluó la presencia de metales en los extractos de *Zingiber officinale*, *Passiflora incarnata*, *Petiveria alliacea L*, mediante la inhibición de crecimiento de la raíces de *Allium Cepa L*.

Crecimiento de la raíces de <i>Allium Cepa L</i> . (mm)														Control Positivo (Cu SO4)	Control Negativo
N° de réplicas	<i>Zingiber officinale</i>				<i>Passiflora incarnata</i>				<i>Petiveria alliacea L</i>						
	0,25	0,5	0,75	1	0,25	0,5	0,75	1	0,25	0,5	0,75	1			
1	0,1	0,4	0,3	0,3	0,1	0,1	0,3	0,5	0,1	0,4	0,1	0,1	0	0,1	
2	0,4	0,3	0,1	0,4	0,4	0,1	0,4	0,4	0,1	0,1	0,1	0,3	0	0,1	
3	0,1	0,1	0,3	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0	0,1	0,4	0,4	0	0,1	
4	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,4	0,4	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	0	1	
5	0,2	0,1	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3	0,4	0,2	0,2	0,1	0,4	0	0,5	
6	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0	0,2	0,3	0	0,3	
7	0,1	0,3	0,3	0,3	0	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,3	0,2	0	0,3	
8	0,1	0,1	0,4	0,3	0,1	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0	0,2	
Prom	0,15	0,1875	0,25	0,2625	0,1375	0,25	0,3	0,313	0,1625	0,1625	0,175	0,2375	0	0,325	
%	53,8	42,3	23	19,2	57,6	23,07	7,69	3,69	50	50	46,1	26,9	0	32,5	

Se utilizó como control negativo agua de grifo del laboratorio de facultad de CCQQ.

Los resultados de esta prueba demuestran que en las concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg/ml de los extractos de las plantas en estudio causan importante inhibición del crecimiento de las raíces de *Allium Cepa L.* En la inhibición del crecimiento de las raíces se notó un aumento en el porcentaje de inhibición a medida que iba aumentando la concentración de los extractos.

La longitud promedio medida de las raíces en el control negativo (agua de grifo - laboratorio) fue de 0.325.

Los resultados de esta prueba nos demuestran que las concentraciones de cada una de las tres muestras, causan importante inhibición del crecimiento de las raíces de *Allium Cepa L* en comparación con nuestro blanco en el cual el crecimiento es ligeramente mayor y nuestro patrón cuyo crecimiento es nulo.

Los resultados Obtenidos en el bioensayo del *Allium Cepa L* nos reflejan la presencia de alguna sustancia tóxica (metales) presente en las muestras analizadas, y teniendo en cuenta la toxicología que presenta los metales en el organismo las convierten en fitofármacos no aptos para el consumo.

Conclusión

En las Buenas Prácticas fitosanitarias se deben abarcar, la identificación de sustancias tóxicas (metales) y la presencia de microorganismos en la materia prima que se utiliza para la elaboración de estos preparados. Un aumento en este tipo de sustancias, pueden traer consigo un sinnúmero de enfermedades a la población que las consume.

La proliferación, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, de preparados comerciales a base de productos naturales con fines medicinales, sin los estándares de calidad para garantizar su seguridad y eficacia, ha sido generalmente incontrolada, representando un riesgo para la salud de los consumidores. Es por esta razón que nos surgió la necesidad de realizar este estudio en donde concluimos que:

1. Se realizó el ensayo de Límite Microbiano para productos no obligatoriamente estériles a las muestras de los extractos de *Zingiber officinale*, *Passiflora incarnata*, *Petiveria alliacea L*, observándose ausencia de microorganismos indicadores patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *E coli* y *Salmonella sp*. En el Recuento Total de Bacterias Aerobias Mesófilas se encontró que las muestras 1, 2 y 3 cumplen con los parámetros establecidos por el Reglamento Técnico Centroamericano para productos de origen Natural; sin embargo en la determinación de hongos y levaduras solamente la muestra 1 y 3 cumplen con las especificaciones establecidas, lo que implica que la muestra 2 no es apta para el consumo humano.
2. Mediante el bioensayo de *Allium cepa L*. identificamos la presencia de sustancias tóxicas (metales) en las tres diferentes muestras de nuestros extractos de *Zingiber officinale*, *Passiflora incarnata*, *Petiveria alliacea L*. por la inhibición del crecimiento de las raíces de las cebollas, de tal manera que esta prueba nos permite clasificar las muestras a base de raíces provenientes de las farmacias herbolarias como no aptas para el consumo humano.

Por lo tanto concluimos que de acuerdo a los resultados de cada uno de los ensayos realizados a los extractos de las diferentes muestras *Zingibier officinale*, *Passiflora incarnata*, *Petiveria alliacea L* no son aptos para el consumo humano.

Recomendaciones

De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro trabajo investigativo sugerimos las siguientes recomendaciones:

A los laboratorios involucrados en la fabricación de medicamentos que realicen un mejor control con respecto a las buenas prácticas de manufactura.

A la población hacer uso racional de los medicamentos debido a que estos pueden provocar efectos adversos.

Proponer un sistema obligatorio en cual establezca un Control Calidad de productos terminados no necesariamente estériles.

Bibliografía:

1. Ramírez R.P. y Mendoza C.A. (2008). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancia químicas en agua y suelo la experiencia en México. México. En Línea:http://books.google.com.ni/books?id=wdJWUOj81isC&printsec=frontcover&dq=bioensayo+de+allium+cepa&hl=es419&sa=X&ei=iBUmUqnoMon_O9A_Sy8oHIBA&ved=0CD_gQ6AEwAw#v=onepage&q=bioensayo%20de%20allium%20cepa&f=false Recuperado:15 de septiembre del 2013.
2. Dra. Marina Teresa Torres Rodríguez. (2003). Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. En Línea: http://www.bvs.sld.cu/revistas/hie/vol41_2-3_03/hie092-3203.htm. Recuperado: 15 de septiembre del 2013.
3. Landis, W, G and Yu, M.(2003). Curso de toxicología ambiental. Universidad Nacional Abierta y a distancia. Estados Unidos. En Línea: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358027/358027/leccin_36_tipos_de_bioensayos.html . Recuperado: 18de septiembre del 2013
4. Arauzo de Zuamaeta Margarita, De Esparza María Luisa, (1995). Toxicidad aguda del cromo usando Allium Cepa L. Programa de control de calidad y desarrollo de laboratorios. Perú. En Línea: <http://www.bvsde.oms.org/bvsacd/scan2/039219/039219.pdf>. Recuperado: de marzo 2014
5. Tarazona Mirabal Hernan, Fitotoxicidad de cobre en lechuga. Universidad de Huanuco. Venezuela. En Línea: http://www.concytec.gob.pe/portalsinacyt/images/stories/corcytecs/huanuco/fitotoxicidad_de_cobre_en_lechuga_unh.pdf Recuperado: 3 de marzo del 2014
6. Vásquez Corrales Edison. (2011). Tóxico cinética y tóxicodinamia del Cobre, Plomo Y Mercurio. En línea. Universidad Católica los Ángeles De Chimbote.

En Línea: <http://www.slideshare.net/Milizitahbg/toxicinetica-y-toxicodinamia-de-pb-hg-y-cu> Recuperado: 3 de marzo del 2014

7. Muños Jines Yhaira Cristina,(4-10-2012). Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de diesel sobre oreochromis niloticus mediante bioensayo. Repositorio de la escuela superior politécnica del litoral. En línea: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/21281> Recuperado:3 de marzo del 2014.
8. Alvares, Alejandra, et al (2003).Cuantificación de plomo y mercurio en productos naturales con fines terapéuticos comercializados en Venezuela. Venezuela. En Línea: <http://www.cadperu.com> Recuperado 10 de marzo de 2014
9. Muñoz, Nicolás M. (2009).Determinación de plomo y cadmio en hierbas medicinales. En Línea: http://www.ub.edu.ar/investigaciones/tesinas/275_Tesina%20Munoz.pdf Recuperado 20 de marzo del 2014.
10. Muñoz-Solarte Diana M, Guerrero-Pepinosa Nancy. (2013). Allium test para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de extractos naturales en células meristemáticas de Allium cepa. En Línea: <file:///C:/Users/mauricio/Downloads/112-227-1-SM.pdf> . Recuperado 20 de marzo del 2014.
11. Republica Argentina, Subsecretaria de recursos hídricos de la nación (2005). Desarrollo de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondiente a plomo. Argentina. En línea: <http://www.pnuma.org/agua-miaac/.../PONENCIAS/.../plomopdf> . Recuperado 2 de marzo del 2014
12. Celis José, Sandoval Marco, Zagal Erick, Briones Mario. (2006) . Adición de biosólidos urbanos y de salmonicultura sobre la germinación de semillas de lechuga (Latuca sativa) en un suelo patagónico. Argentina. En línea

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-27912006000300002 Recuperado 10 de marzo 2014.

13. La bitácora de la salud (2012).Recopilación de artículos sobre salud, dietas sanas, prevención de enfermedades, avances médicos, artículos de opinión. En Línea <http://bitacoradelasalud.blogspot.com/2012/09/propiedades-del-jengibre.html> Recuperado 11 de marzo del 2012
14. Hall Ramírez, Victoria, et al. (2002). Monografía de plantas medicinales. En Línea: <http://sibdi.ucr.ac.cr/boletinespdf/cimed27.pdf> Recuperado el 11 de marzo del 2014
15. Emilia Ruiz Moreno, Benita Urbina, Yadira Salmerón Mendoza (2012). Determinación de plomo en raíces de Valeriana Officinalis, Smilax aspera, L. Panax Ginseng mediante la marcha analítica y la biotoxicidad por Allium Cepa L. Monografía para optar al título de licenciado Químico Farmacéutico. UNAN-LEON Nicaragua.
16. Biblioteca Digital de la medicina tradicional mexicana (2009).Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana (hierba del zorrillo).México. En línea: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Petiveria%20alliacea&id=7970> Recuperado 18 de marzo 2014
17. Biblioteca Nacional de Medicina de Medicina de EEUU (2014). Medline Plus, Información de salud para Usted (Jengibre).Estados Unidos. En Línea. De: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/natural/961.html> Recuperado 10 de junio del 2014
18. Herbotecnia (2004).Ensayo de Botánica Médica Argentina .Imprenta Pablo E Conti. Argentina .En Línea: De: <http://www.herbotecnia.com.ar/aut-petiveria.html> Recuperado el 10 de junio del 2014.

19. Reglamento del sistema nacional de control de productos farmacéuticos de uso Humano (2010). Guía de especificaciones de productos farmacéuticos terminados. En Línea: [http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/41685335a44f1c70032579e40069ed82/\\$FILE/Guia%20de%20especificaciones.pdf](http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/41685335a44f1c70032579e40069ed82/$FILE/Guia%20de%20especificaciones.pdf) Recuperado 11 de junio del 2014
20. Reglamento Técnico Centro Americano. Productos Farmacéutico Productos naturales para uso humano, verificación de la calidad. Ministerio de economía MINECO. En Línea: http://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/proyectos-y-propuestas-de-ley/doc_view/18-anexo-5-productos-naturales-para-uso-humanoverificacion-de-la-calidad Recuperado 11 de junio del 2014.
21. Torres Ramírez Nausy Lorena (2006). Análisis microbiológico de materias primas utilizadas en la elaboración de productos naturales en la industria colombiana. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana. En Línea: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis251.pdf> Recuperado 15 de junio 2014
22. Archila Jimenez Robert William (2009). Propuesta de un manual de procedimientos microbiológicos para pruebas de límites microbianos en productos farmacéuticos no estériles. El salvador. En Línea: <http://ri.ues.edu.sv/2525/1/16100693.pdf> Recuperado: 20 de junio del 2014
23. Rios Colque, KR. Riquez Álvaro, IK. (2007). Determinación del Recuento Microbiano de Productos Derivados de la Maca (*Lepidium meyenii* W.) utilizando Placas Petrifilm y su comparación con el método tradicional. Monografía para optar al grado de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. En línea: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1095/1/riquez_ai.pdf. Recuperado 20 de junio del 2014

24. Garcés, A. Gutiérrez, S. Infante, W. Saravia, K. (2009). Control Microbiológico de Materias Primas y Productos Farmacéuticos no estériles. Laboratorio de Microbiología. Venezuela. En línea: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedra_Micro/1_0_Control_Microbiol%C3%B3gico_PNE.pdf Recuperado 20 de junio del 2014
25. Fonnegra G Ramiro, Jimenes R Silvia Luz (2007). Plantas Medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquia. Colombia. En Línea: http://books.google.com.ni/books?id=K8eI-7ZeFpsC&pg=PA150 & lpg= PA 150 &dq=zingiber+officinale +etimologia&source=bl&ots=6Dr1C9qR7y&sig=eFE9R9x7a_fSKO9uWBoSbxxDiAc&hl=es-419&sa=X&ei=qj6rU4GYNefC8QH_o4CQBw&ved=0CB8Q6AEwAA#v=onepage&=zingiber%20officinale%20etimologia&f=false. Recuperado:3 de julio del 2014
26. Espíritu Gaia. *Passiflora Incarnata*. Plantas Medicinales. En Línea: <http://www.espiritugaia.com/Pasiflora.htm> Recuperado:3 de julio del 2014
27. Herbotecnia (2004): *petiveria alliacen L*. Argentina, en línea: <http://www.herbotecnia.com.ar/aut-petiveria.html> Recuperado:3 de julio del 2014
28. Muñoz Solarte, DM. Guerrero Pepinosa, N. (2012). Allium test para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de extractos naturales en células meristemáticas de *Allium cepa*. Memorias, 11(19), 83-86. Junio 1012. En línea: <http://revistas.ucc.edu.co/index.php/me/article/view/112/113>. Recuperado: 03 de Julio 2014.

ANEXOS

Anexo.1

Entrevista no estructurada.

-Saludo.

Somos estudiantes de la carrera de Farmacia de la Unan León, estamos realizando nuestra monografía, pedimos su colaboración.

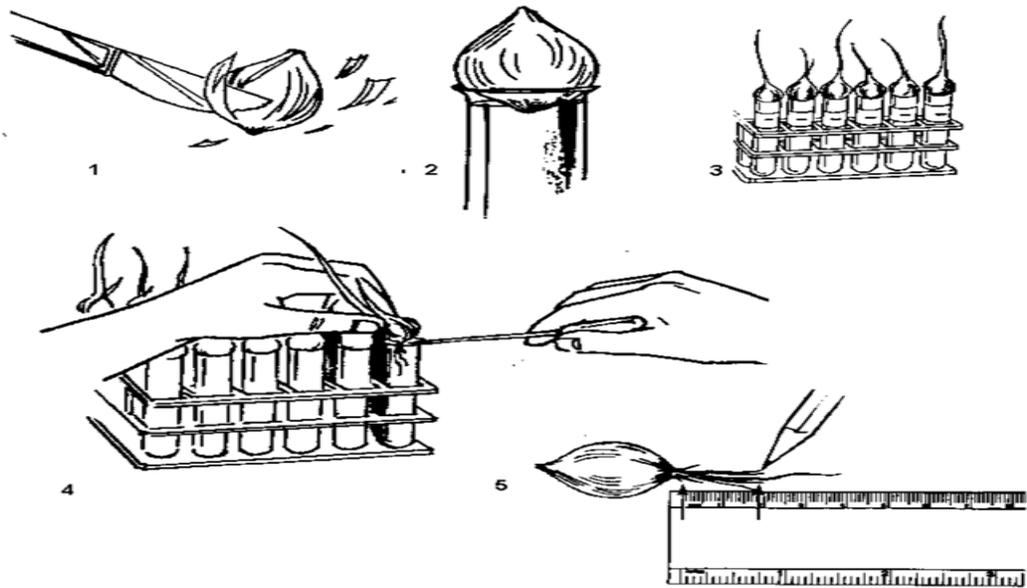
- ✓ Comercializan plantas medicinales a base de raíces?
- ✓ Nos puede mencionar algunos de los productos..
- ✓ Cuales son las plantas de mayor demanda por la población?
- ✓ Cual es su valor?

-Despedida.

Anexo 2.

Bioensayo de toxicidad aguda para la determinación de minerales con *Allium cepa* L.

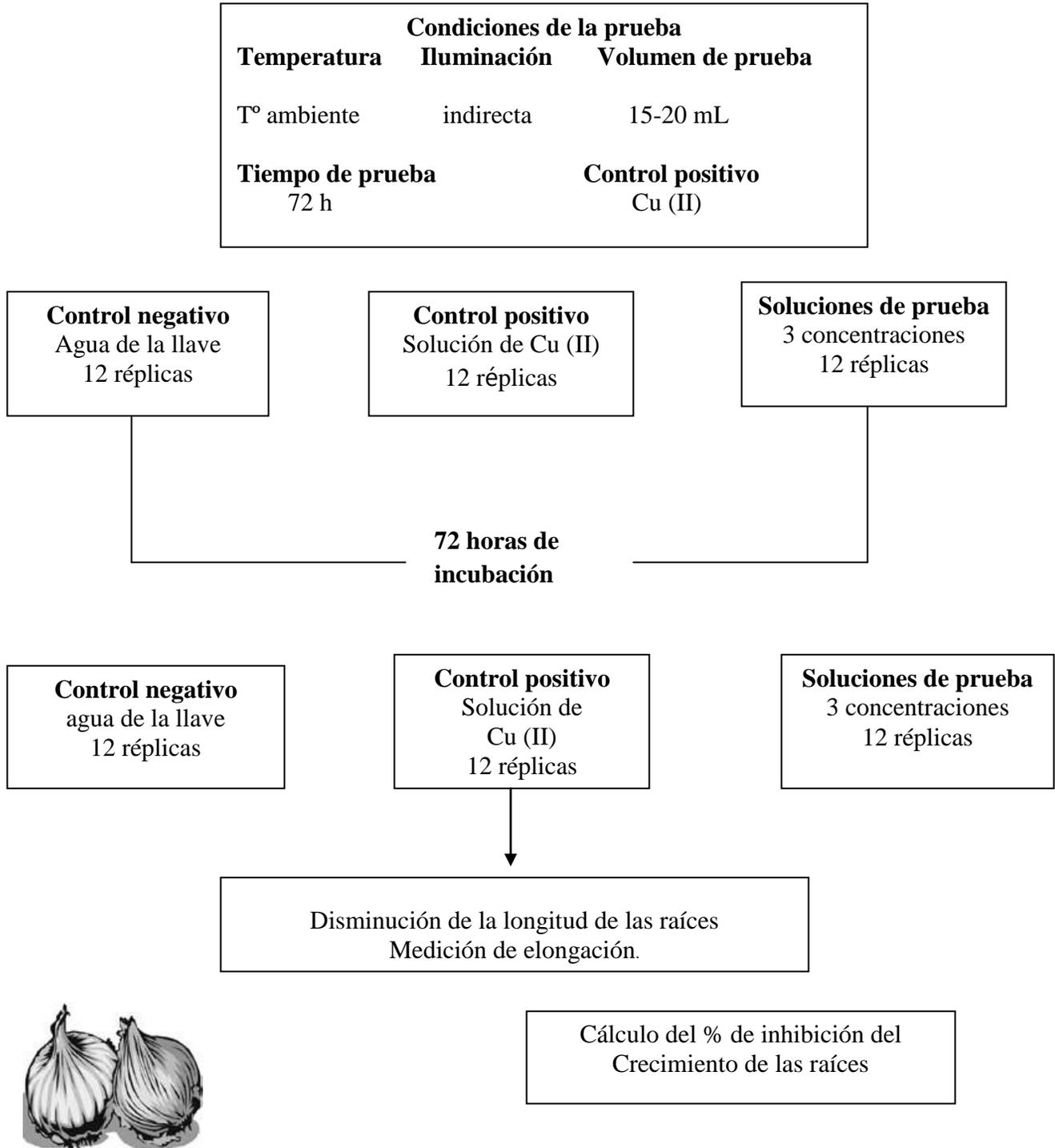
Esquema gráfico de los pasos a seguir en la prueba con *Allium cepa* L



- ✓ Limpieza y pelado de bulbos.
- ✓ Ubicación de bulbos en tubos para exposición a las soluciones de ensayo.
- ✓ Colocación de tubos en soporte.
- ✓ Agregado de soluciones en los tubos durante el ensayo.
- ✓ Medición de longitud del haz de raíces al finalizar el tiempo de exposición de los bulbos.

Anexo 3.

Bioensayo de toxicidad con *Allium Cepa L.*



Imágenes de las Plantas a las que pertenecen los extractos.

Zingiber officinale (jengibre).



Petiveria alliacea L. (zorrillo)



Passiflora incarnata.



Anexo 5

Gráfico.1

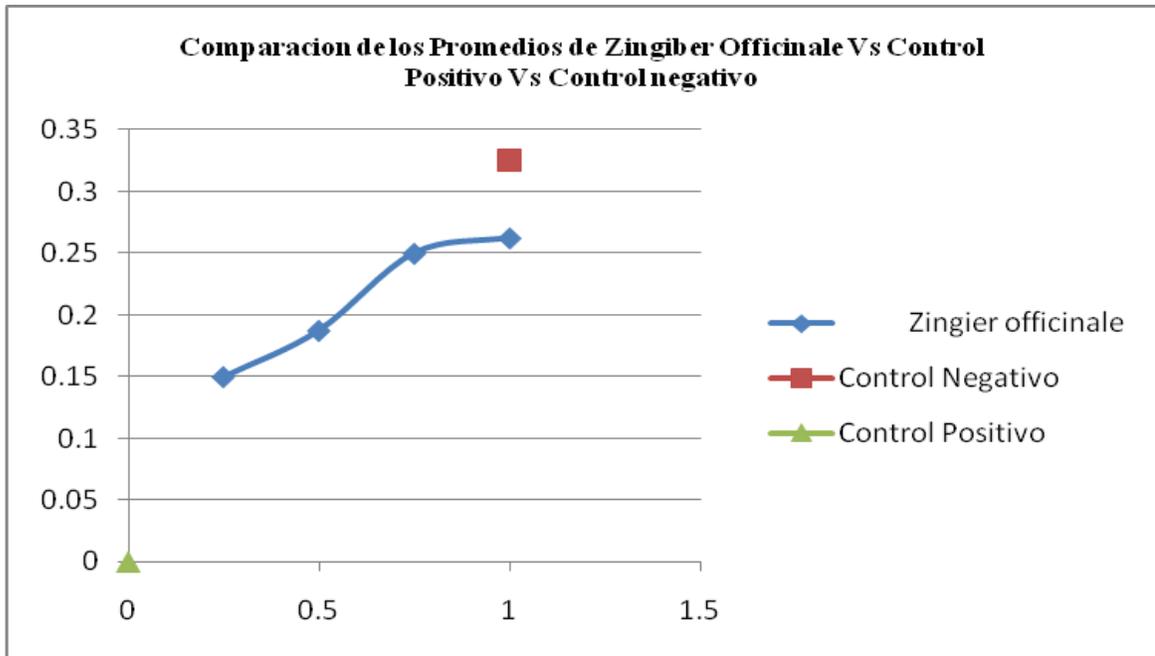


Gráfico.2

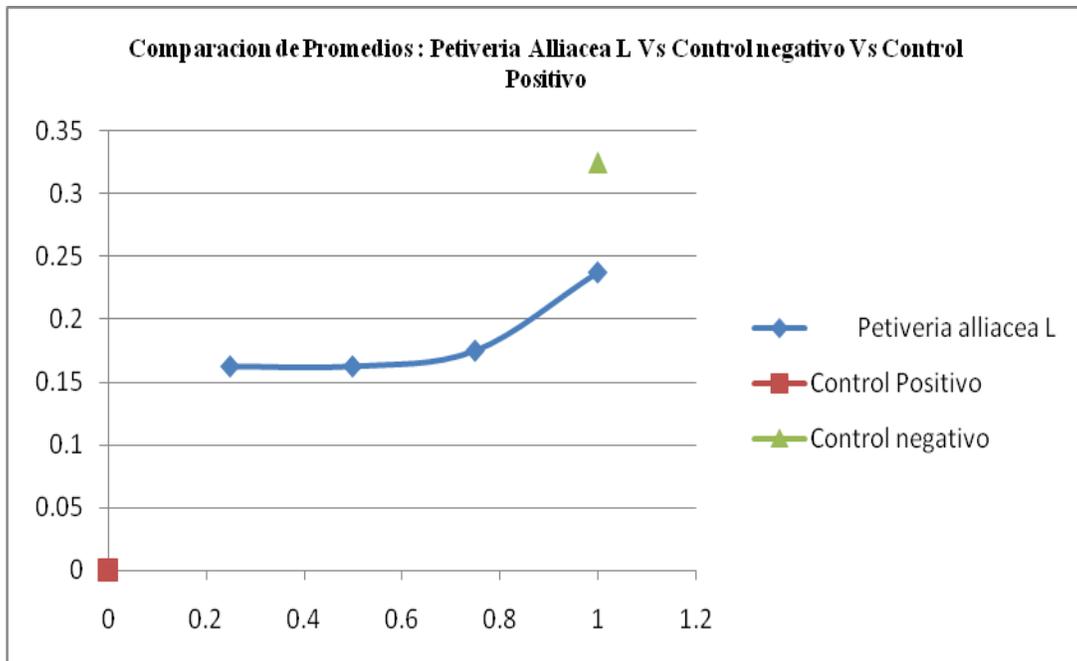
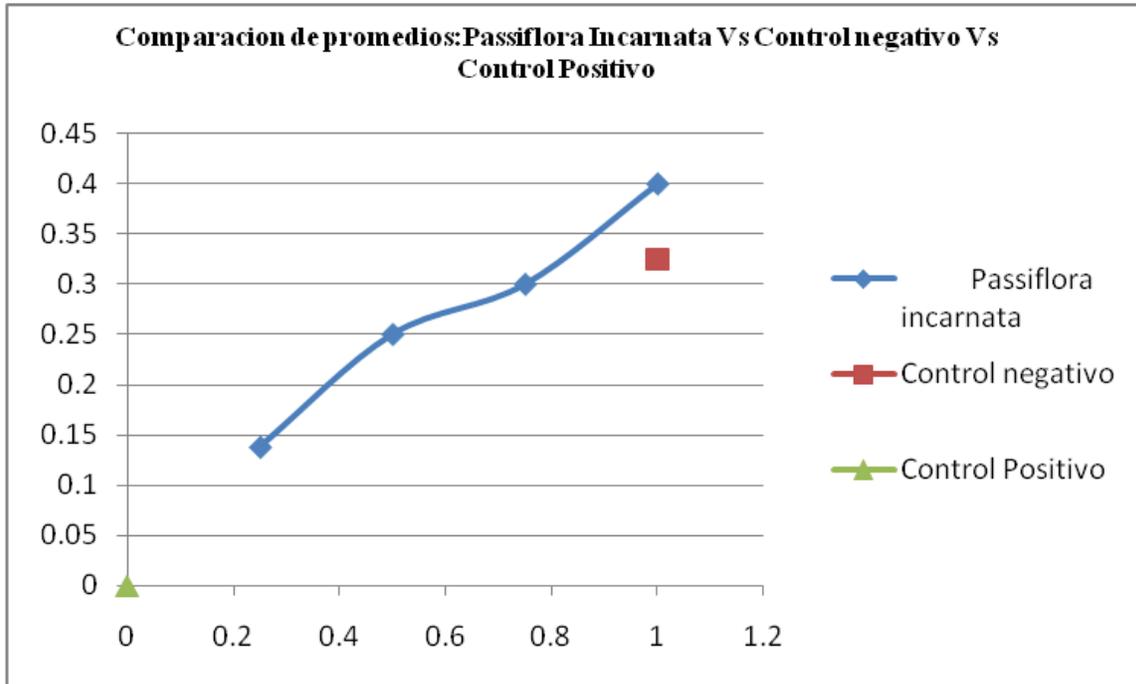


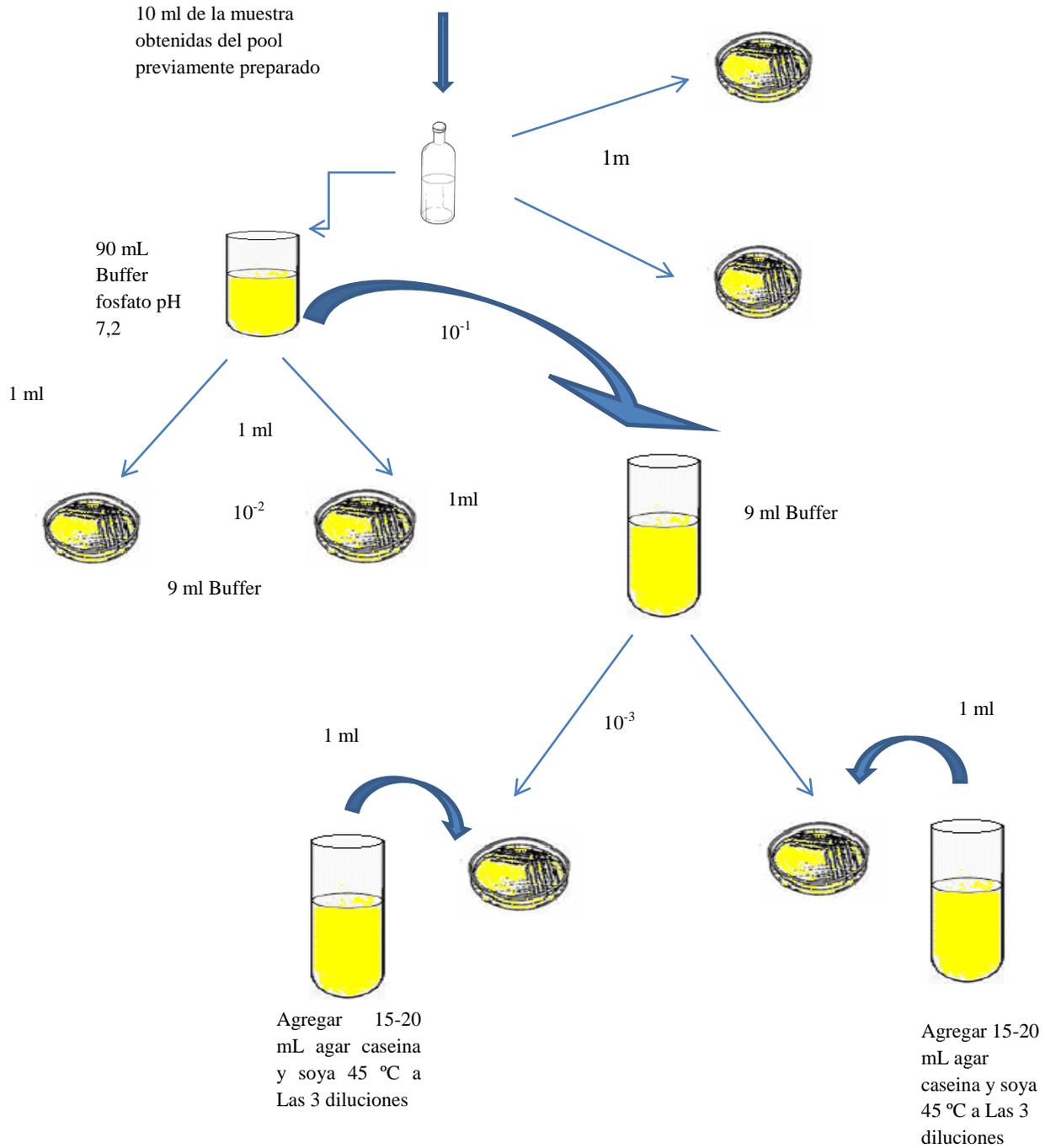
Gráfico.3



En los gráficos #1, 2,3 los valores promedios de crecimiento de las raíces de Allium cepa L en las tres concentraciones de los extracto de Zingier officinale, Passiflora incarnata, Petiveria alliacea L, respectivamente se puede observar una aproximación del valor del control positivo a la de los extractos a la concentración de 0.5, 0.75 mg/ml.

Anexo 6

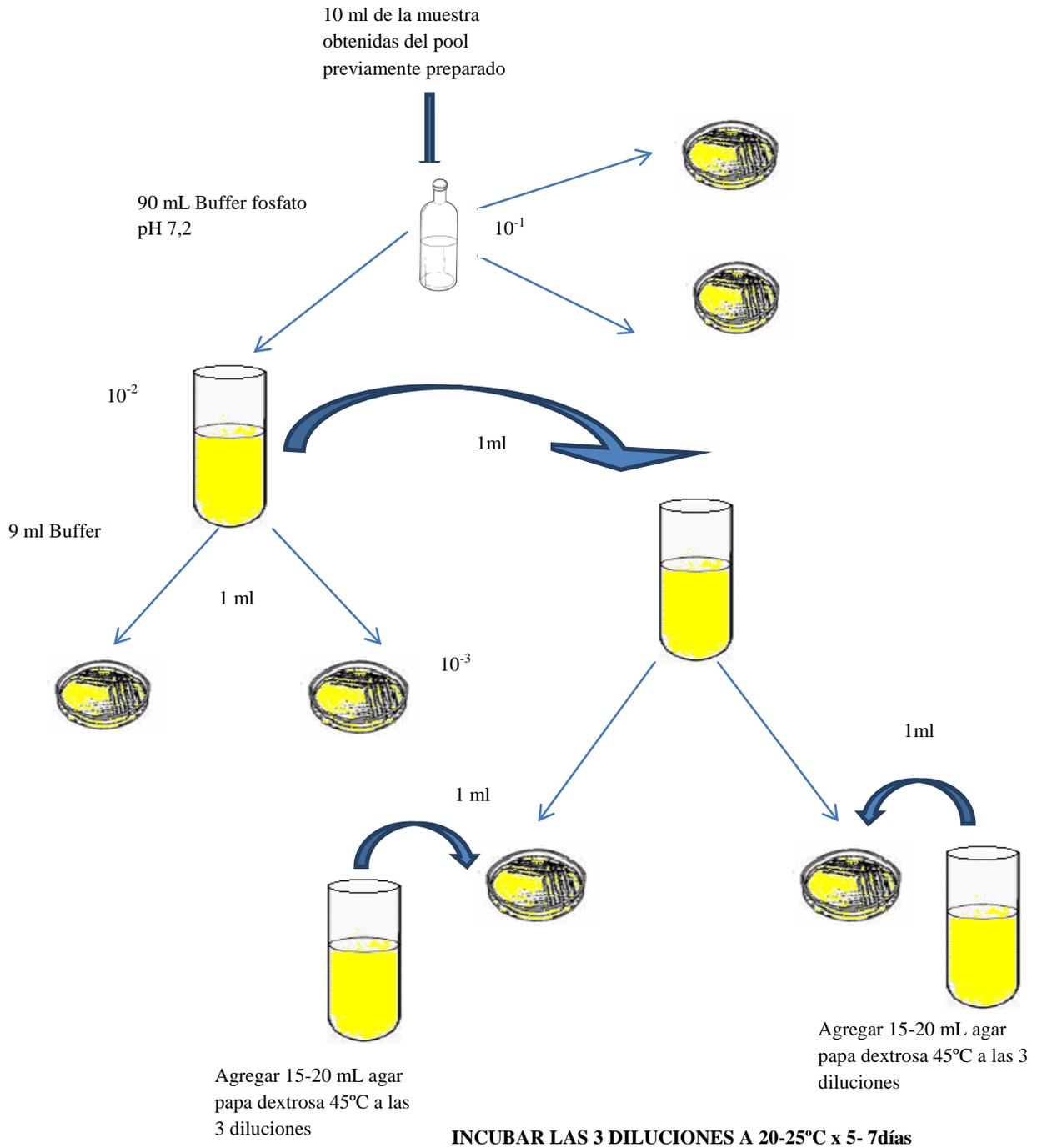
Procedimiento del Ensayo del límite microbiano. Para recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas.



INCUBAR LAS 3 DILUCIONES A 30-35°C x 24 Horas

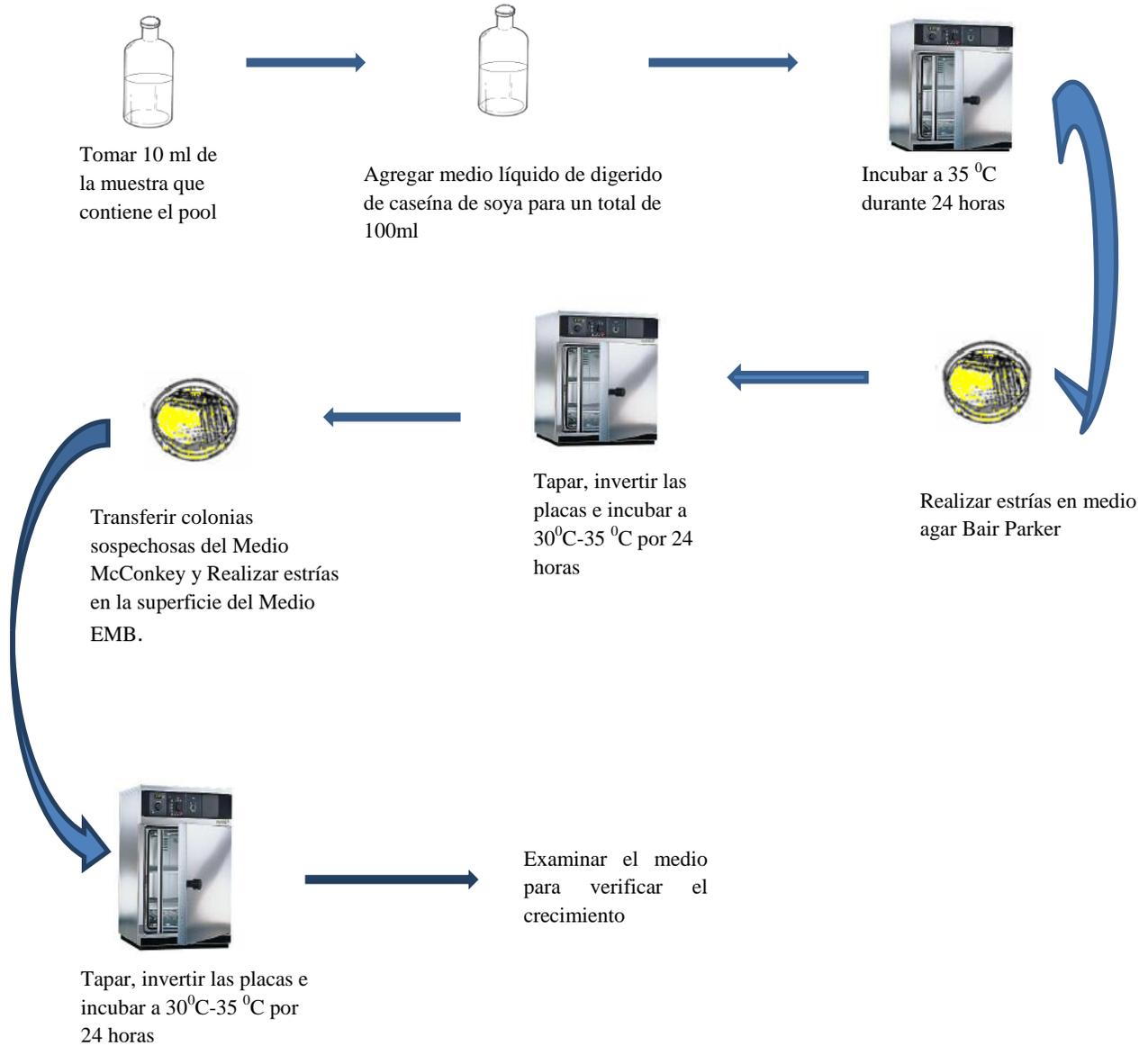
Anexo 7

Procedimiento para Recuento Total Combinado de Hongos y Levaduras.



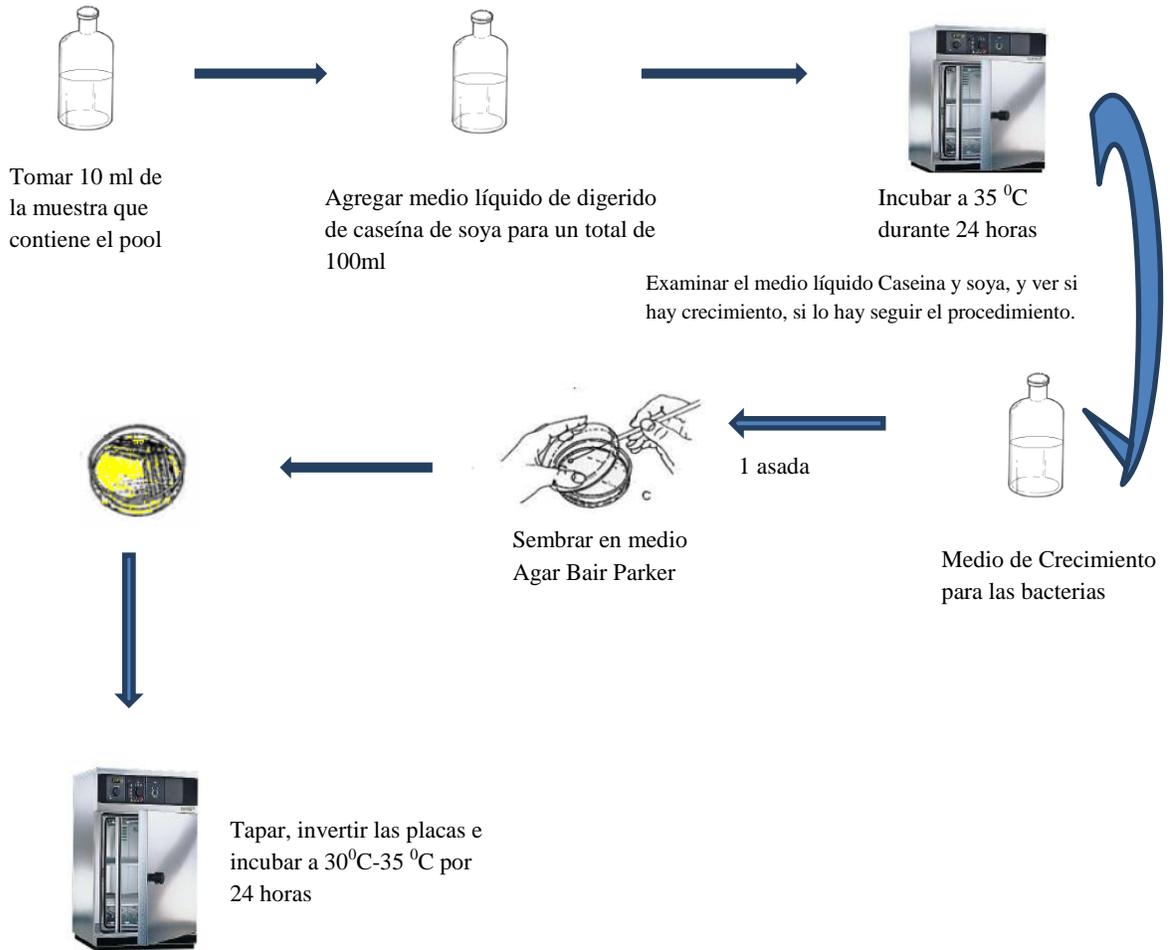
Anexo 8

Procedimiento para la determinación de *Escherichia Coli*.



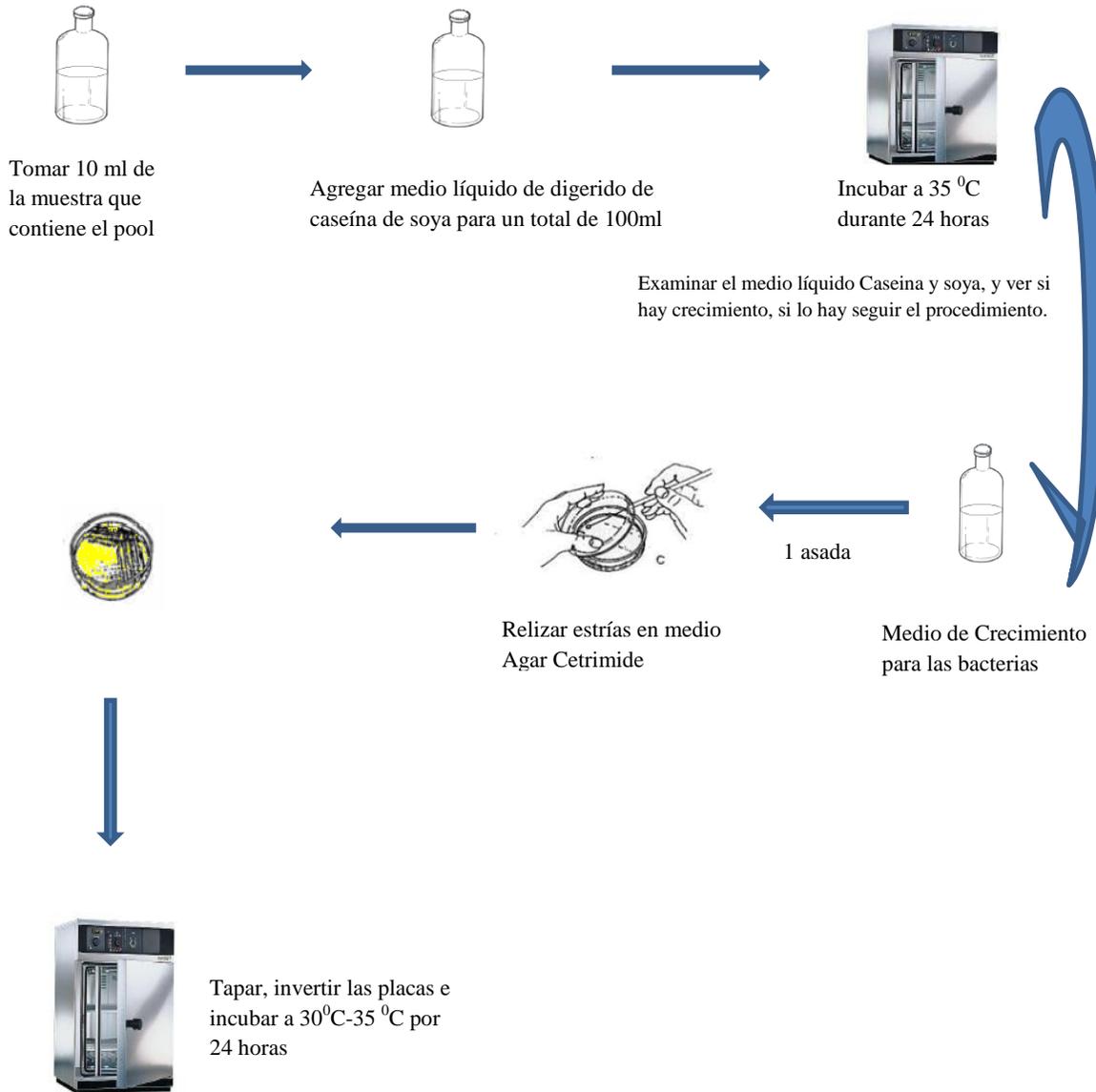
Anexo 9

Procedimiento para la determinación *Staphylococcus aureus*



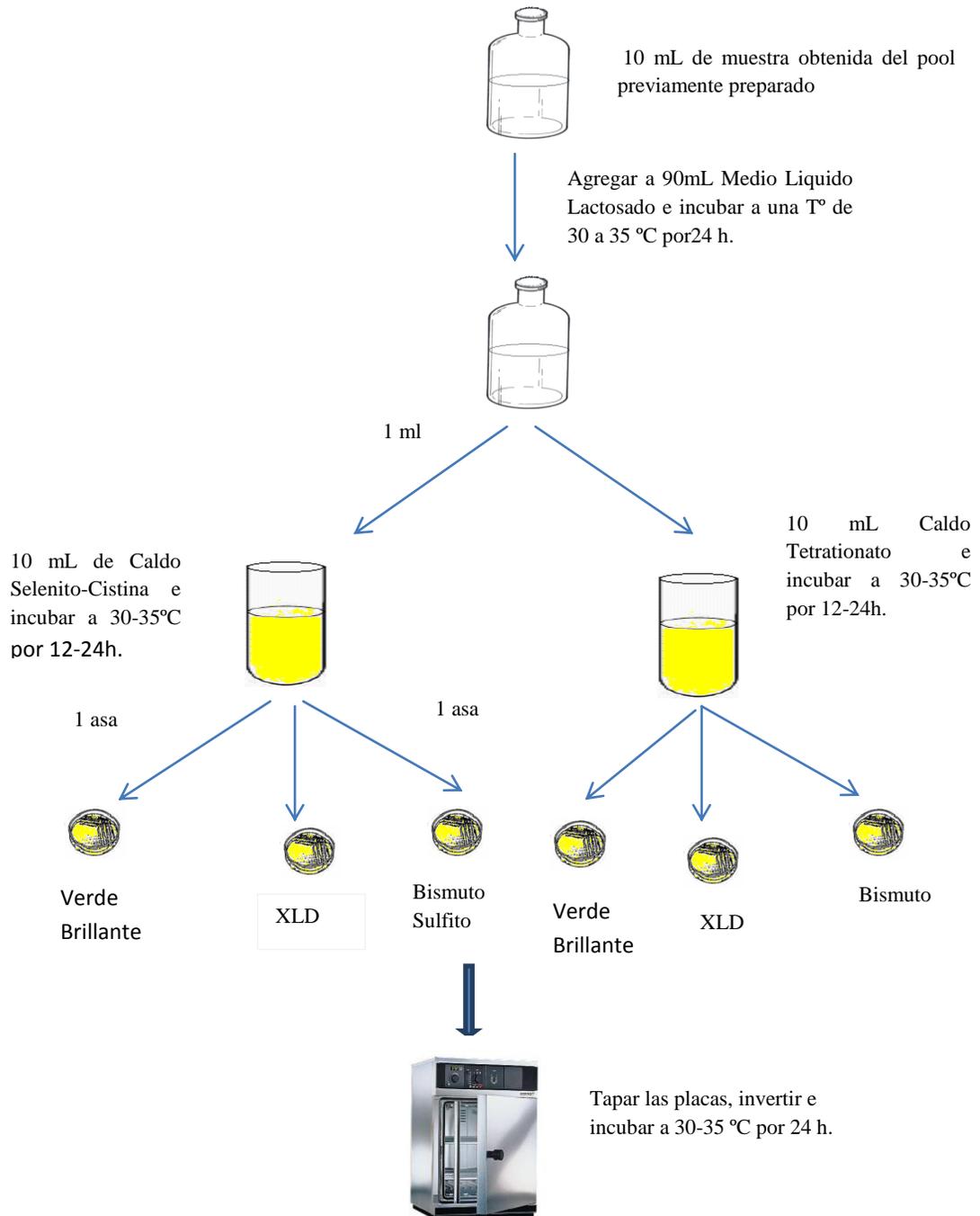
Anexo 10

Procedimiento para la determinación de *Pseudomonas aeruginosa*



Anexo 11

Procedimiento para la determinación de *Salmonella Spp*



Anexo 12

Preparación de los Medios de cultivo

Preparación del fosfato monobásico de potasio:

- ✓ Se tomaron 34 gramos de fosfato monobásico de potasio y se aforó en un erlenmeyer de 1000ml (Solución sobresaturada de fosfato monobásico de potasio)
- ✓ De la solución sobre saturada se tomaron 0.3375 ml y se aforó hasta 270 ml se le midió el pH esperando obtener 7.2 ± 0.1 . Si la solución es básica se le agrega una solución de HCL 0.1N previamente estandarizado, si la solución está ácida se le agrega una solución de NaOH 0.1N previamente estandarizado.
- ✓ Luego con una probeta se miden 90 ml de la solución y se transfieren a tres erlenmeyer que luego pasaron a ser esterilizados a 121°C a 1 atmósfera de presión durante 15 minutos y luego se almacenó en refrigeración.

Preparación de Digerido de Caseína de Soya

- ✓ Se pesaron 24gr de Digerido de Caseína de Soya se agregaron 600ml de agua destilada a ebullición y seguidamente lo agitamos.
- ✓ Se calentó en una cocina para lograr una solución transparente
- ✓ Se midió el pH (con un peachímetro) esperando obtener un pH 7.3 ± 2 . Si la solución es básica se le agrega una solución de HCL 0.1N previamente estandarizado, si la solución está ácida se le agrega una solución de NaOH 0.1N previamente estandarizado.
- ✓ Se sometió a una autoclave a 121°C por 15 min a 1 atmósfera de presión, luego se le midió nuevamente el pH por efectos de temperatura.
- ✓ Para finalizar se colocó en baño maría para evitar enfríe el medio de cultivo Digerido de Caseína de Soya.

Preparación de Caldo Lactosado

- ✓ Se pesaron 7.8 gr de caldo lactosado se agregaron 600ml de agua destilada a ebullición y seguidamente lo agitamos.
- ✓ Se calentó en una cocina para lograr una solución transparente
- ✓ Se midió el pH (con un peachímetro) esperando obtener un pH 7.3 ± 2 . Si la solución es básica se le agrega una solución de HCL 0.1N previamente estandarizado, si la solución está ácida se le agrega una solución de NaOH 0.1N previamente estandarizado.
- ✓ Se sometió a un autoclave a 121°C por 15 min a 1 atmósfera de presión, luego se le midió nuevamente el pH por efectos de temperatura.
- ✓ Para finalizar se colocó en baño maría para evitar enfríe el medio de caldo lactosado.

Preparación del Agar Sabraud:

- ✓ Se pesaron 24gr Agar Sabraud, se agregaron 600ml de agua destilada a ebullición y seguidamente lo agitamos.
- ✓ Se calentó en una cocina para lograr una solución transparente
- ✓ Se midió el pH (con un peachímetro) esperando obtener un pH de 7.2. Si la solución es básica se le agrega una solución de HCL 0.1N previamente estandarizado, si la solución está ácida se le agrega una solución de NaOH 0.1N previamente estandarizado.
- ✓ Se sometió en un autoclave a 121°C por 15 min a 1 atmósfera de presión, luego se le midió nuevamente el pH por efectos de temperatura.
- ✓ Para finalizar se colocó en baño maría para evitar que se enfríe el medio de cultivo agar sabraud.

Anexo 13

Tabla de descripción de los extractos.

Presentación	Marca	Número de muestras
Jarabe (Zarzaparrilla)	Sahves 100% natural	2 de 240 ml y 1 de 60 ml
Jarabe de (Raiz de zorrillo)	Mi Salud	8 de 60 ml
Jarabe de (Jengibre)	ISNAYA	8 de 60 ml

Abreviaturas.

BL: biosólidos de salmonicultura en lago

IG: índice de germinación.

Bu: lodo urbano

Bp: biosólidos de piscicultura.

CI₅₀: concentración inhibitoria media.

CTC: concentración toxica de cromo.

ppm: parte por millón.

Cu: cobre.

OECD: The Organisation for Economic Co-operation and Development.

USEPA: The United States Environmental Protection Agency.

APHA: Agua dura reconstituida.

CI50: representa la concentración de un fármaco que se requiere para una inhibición del 50% in vitro.

CE50: concentración media que causa 50% de respuesta máxima.

NOEC: (*No observed effect concentration*) la concentración más alta de tóxico (de las empleadas en un bioensayo) que no causa efecto (mortalidad, alteraciones de la reproducción, cambios comportamentales, etc.) en la población estudiada para una exposición determinada, al ser comparado su efecto con el control.

LOEC:(*Lowest observed effect concentration*) la concentración más baja de tóxico (de las empleadas en un bioensayo) que causa efecto (mortalidad, alteraciones de la reproducción, cambios comportamentales, etc.) en la población estudiada para una exposición determinada (=tiempo) al ser comparado su efecto con el control.

UPCH: Universidad Peruana Calletano Heredia.

Mg ha⁻¹: Mg es un mega gramo igual a 1×10^6 gramos o una tonelada métrica. Se utiliza para evitar la confusión con diferentes normas para tonelada en varios países.

Mg C ha⁻¹ es el equivalente de toneladas métricas (o mil kilos) de carbono producidos por hectárea por año.

Glosario.

Adulteración: Alteración de la calidad o pureza de algo por la adición de una sustancia extraña.

Antropogénica: Que es de origen humano, que es producido por el hombre.

Ayurveda: es un antiguo sistema de medicina tradicional originado en la India.

Aspergillus nidulans D-30: hongo diploide de segregación mitótica usado en ensayos a corto plazo in vitro.

Bacterias: Organismo microscópico unicelular, carente de núcleo, que se multiplica por división celular sencilla o por esporas, las bacterias son los agentes causantes de numerosas enfermedades; las bacterias son los principales componentes del reino de las móneras; según su forma, las bacterias reciben un nombre distinto (cocos, bacilos, espiroquetas, vibriones).

Bioensayo: Prueba en la cual la naturaleza peligrosa de una sustancia es determinada por su reacción con un tejido o un organismo vivo.

Biocenosis: Conjunto de seres vivos que habitan un biotopo.

Citotóxico: Término usado para describe todo aquello que daña las células. También usado con el nombre de un tipo de célula T.

Ecotoxicología: Nueva división de la toxicología que trata del estudio de químicos persistentes que pueden ejercer varios efectos tóxicos en varios sitios de un ecosistema.

Epidermis: Es la capa más externa de la piel, constituida por un delgado epitelio de células en continua renovación (los queratinocitos). No tiene vasos sanguíneos ni linfáticos, pero sí que hay muchas terminaciones nerviosas. La epidermis está formada por cuatro estratos diferenciados: el córneo, el granuloso, el espinoso y el basal.

Fitofármacos: 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.

Fitotoxicidad: Toxicidad por algún producto químico para las plantas cultivadas.

Genotóxico: Agente que, a niveles subtóxicos de exposición, producen algún tipo de alteración en el material genético o en sus componentes asociados. Bajo este término se incluyen los agentes que interaccionan tanto directa como indirectamente, con el ADN provocando mutaciones, y los que interfieren en algunos procesos enzimáticos de la reparación, o en la génesis o polimerización del material proteico involucrado en la segregación cromosómica.

Hipocótilo: Parte del eje caulinar que, en la semilla, se encuentra debajo de la inserción de los cotiledones. Se opone a epicótilo.

Hongos: Los mohos son hongos filamentosos multicelulares cuyo crecimiento en la superficie de los alimentos se suele reconocer fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso; la parte principal de su crecimiento suele tener un aspecto blanco, aunque puede tener colores distintos, color oscuro o color humo.

Mesófilo: es un término botánico que designa el tejido que se encuentra entre la epidermis o del haz de las hojas.

Microorganismos aerobios: organismos que necesitan del oxígeno para vivir o a los procesos que lo necesitan para poder desarrollarse.

Mitótico: Perteneciente o relativo a la mitosis.

Meristemáticas: Relativo al meristemo.

Primordio: conjunto de células del meristema que mediante sucesivas divisiones generan los órganos de las plantas: los primordios seminales dan lugar a las semillas.

Radícula: Extremo basal del eje embrionario, raíz originada en la semilla y que dará la raíz primaria.

Sobredosificación: Aumento o exceso en la dosis adecuada: la sobredosificación de los medicamentos no debe realizarse sin prescripción médica.

Toxicidad: grado de efectividad que poseen las sustancias que, por su composición, se consideran tóxicas.

Unidades formadoras de colonias: es una estimación del número de bacterias o de hongos viables.

Imágenes del bioensayo del *Allium cepa* L.



Imágenes del ensayo del Límite Microbiano.

