

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua

UNAN- LEÓN

Facultad de Ciencias Químicas

Escuela de Farmacia



“A la Libertad por la Universidad”

INFORME FINAL DE TESIS

Para optar al título:

Licenciado Químico-Farmacéutico

**DETERMINACIÓN DEL LÍMITE MICROBIANO DE JARABES DE
GUAYABA (*PSIDIUM SPP.*) COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD
DE LEÓN JULIO- AGOSTO DE 2011.**

Autores:

Br. Ronier Lenin Hernández Rueda

Br. Skarleth Lucia Merlos Carrero

Tutor:

Dr. Francisco Beteta González

Asesores

MSc. Fernando Baca

Dr. Félix Espinoza

León, 15 de noviembre de 2011

AGRADECIMIENTO

A Dios, nuestro padre amantísimo por habernos permitido culminar esta parte tan importante en nuestras vidas.

A nuestros padres, por ser motor, apoyo incondicional y parte indispensable en nuestras vidas.

A Dr. Octavio Guevara, Dra. María Lily Orozco, Dr. Félix Espinoza, MSc. Margarita Paniagua, MSc. Fernando Baca, MSc. Lisseth Arauz, Sr. David Espinoza, Sra. Gladis Rojas y a todo el personal que nos dio su apoyo, ya que sin su ayuda no habríamos podido realizar este estudio.

A nuestro tutor y profesores, que se convirtieron en nuestros guías y nos enseñaron el camino a seguir.

A nuestros amigos, por llenarnos de valor, alegría y motivación en cada momento difícil en este duro camino.



ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Planteamiento del Problema	3
3. Hipótesis	4
4. Objetivos	5
4.1 Objetivo General	5
4.2 Objetivos Específicos	5
5. Marco Referencial	6
5.1 Definiciones	6
5.2 Jarabes	8
5.3 Componentes de los jarabes	8
5.4 Métodos de Obtención	8
5.5 Guayaba	9
5.6 Buenas Prácticas de Manufactura de Fitofármacos	12
5.7 Infiltración Microbiológica	13
5.8 Microorganismos	15
5.8.1 Escherichia coli	15
5.8.2 Salmonella spp	15
5.8.3 Pseudomona aeruginosa	16
5.8.4 Staphylococcus aureus	17
5.8.5 Clostridium	18
5.8.6 Shigella	19



5.9 Medios de Cultivo	20
5.10 Pruebas Bioquímicas	22
6. Material y Método	25
6.1 Tipo de Estudio	25
6.2 Área de Estudio	25
6.3 Universo de trabajo	25
6.4 Muestra	25
6.5 Tipo de muestreo	25
6.6 Variantes de Interés	25
6.7 Criterios de Inclusión	25
6.8 Criterios de Exclusión	25
6.9 Materiales	26
6.10 Método	26
6.10.1 Conteo total de Anaerobios	26
6.10.1.1 Pre-tratamiento de la Muestra	26
6.10.1.2 Recuento en placas	27
6.10.1.3 Identificación de la presencia de microorganismos específicos	27
7. Resultados	29
8. Discusión	31
9. Conclusión	32
10. Recomendaciones	33
11. Referencias	34
12. Anexos	36



INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional y natural forma parte del acervo cultural de la humanidad, la cual, se ha desarrollado en cada país y región del mundo con características propias; en América Latina el estudio de las plantas medicinales es de gran importancia, puesto que el avance tecnológico en la industria farmacéutica ha propiciado la elaboración de nuevos y más eficaces medicamentos, en especial con los fitofármacos o productos derivados de plantas medicinales.

Existe un movimiento a favor de los productos naturales, el cual busca alternativas más económicas y eficaces para proteger la salud de una manera más natural, lo que explica en gran medida el incremento acelerado del uso y comercialización de dichos productos, lo que hace necesario la existencia de normas para realizar un control legal y estricto de estos productos, garantizando así la calidad sanitaria.

Algunos gobiernos de los países que conforman la región de Iberoamérica, han reconocido recientemente la necesidad de regular los aspectos básicos de esta actividad, estimulando la reglamentación específica sobre estos bienes de consumo; se ha creado un Reglamento Técnico Centroamericano para Productos Naturales para uso humano, Verificación de la calidad, RTCA 11.03.56:09, cuyo objeto es establecer las pruebas analíticas que deben ser realizadas para comprobar la calidad de los productos naturales de uso humano y asegurar a la comunidad que los productos naturales en su etapa final de distribución, mantienen inalterables sus características iniciales de acuerdo a su formulación.²

En febrero del año 2007, en un estudio realizado en la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, escuela de farmacia, en la Determinación del límite microbiano de 10 frascos de jarabe de carao, con mayor demanda por la población, comercializado en los centros naturistas de la ciudad de León, en la que se encontró la presencia de bacterias aerobias mesófilas, hongos y levaduras menor de 10 UFC/ ml y la ausencia de bacterias patógenas.⁵



En el año 2010, en Riobamba- Ecuador, en la escuela politécnica de Chimborazo en la facultad de ciencias de la escuela de bioquímica y farmacia, se realizó un estudio titulado Elaboración y control de calidad de comprimidos farmacéuticos de ajeno (*Artemisia absintium l.*), romero (*Rosamarinus officinalis L.*) y manzanilla (*Matricaria chamomilla L.*) para combatir la menstruación dolorosa, en la que se determinó que tanto la droga cruda como el producto final en los que se investigó la presencia de aerobios mesófilos totales, coliformes totales, coliformes fecales, mohos y levaduras, encontrándose dentro de los parámetros establecidos por la metodología OMS (1998) y AOAC (1995), asegurando una buena condición higiénica y por tanto no presenta riesgo para la salud humana.¹³

De igual manera se han realizado en diferentes países estudios donde se verifica la calidad de diversos medicamentos de origen natural, en los que, se han aplicado controles microbiológicos exhaustivos para comprobar el cumplimiento de las normas establecidas por el Reglamento Técnico Centroamericano para Productos Naturales para uso humano Verificación de la calidad. RTCA 11.03.56:09, debido a que las plantas medicinales con las que se elaboran dichos medicamentos pueden en alguna parte del proceso de producción contener o adquirir algún tipo de contaminación microbiológica y que en lugar de sanar al paciente puedan complicar aún más su estado de salud. Cabe mencionar, que ninguno de los estudios realizados a plantas medicinales, ha sido realizado en el jarabe de guayaba, que es nuestro jarabe en estudio.²

Las plantas las cuales por crecer y ser recolectadas en campos abiertos y ser procesados, se encuentran más expuestos a contaminación microbiológica, que luego, al ser administrados, si estos están contaminados, pueden causar múltiples enfermedades agravando la salud del paciente; razón por la cual es necesario que se les apliquen controles microbiológicos para comprobar y asegurar que se encuentren libres de microorganismos patógenos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cumplen los jarabes de guayaba comercializados en la ciudad de León con los límites microbiológicos establecidos por la OMS, Directrices para evaluar la calidad de las hiervas medicinales en relación con los contaminantes y residuos; determinación de microorganismos y del Reglamento Técnico Centroamericano de productos Naturales de uso Humano, verificación de la calidad?

HIPÓTESIS

Ho: Los jarabes de guayaba (*Psidium spp.*) comercializados en la ciudad de León en el periodo julio - agosto del 2011 cumplen con los límites microbiológicos establecidos por la OMS, Directrices para evaluar la calidad de las hiervas medicinales en relación con los contaminantes y residuos; determinación de microorganismos y del Reglamento Técnico Centroamericano de productos Naturales de uso Humano, verificación de la calidad.

Ha: Los jarabes de guayaba (*Psidium spp.*) comercializados en la ciudad de León en el periodo julio - agosto del 2011 no cumplen con los límites microbiológicos establecidos por la OMS, Directrices para evaluar la calidad de las hiervas medicinales en relación con los contaminantes y residuos; determinación de microorganismos; y del Reglamento Técnico Centroamericano de productos Naturales de uso Humano, verificación de la calidad.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar el límite microbiano de jarabes de guayaba (*Psidium spp.*) comercializados en la ciudad de León.

Objetivos Específicos.

1. Cuantificar la cantidad total de microorganismos aerobios viables en la muestra.
2. Identificar la presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium spp*, *Shigella spp*. en la muestra.

MARCO REFERENCIAL

Definiciones.

Fitofármaco: Es un extracto estandarizado de una planta o de partes de ésta, que contiene principios activos responsables de la actividad farmacológica.²

Fitofarmacología: Es la rama de la farmacología que se orienta al estudio de los extractos estandarizados de plantas medicinales.²

Forma farmacéutica: Es la forma física que se le da a un producto natural para su adecuada dosificación, conservación y administración.²

Materia extraña: Es cualquier material o sustancia diferente a la declarada o especificada en la fórmula cuali-cuantitativa del producto natural.²

Material natural estandarizado: Es un extracto (sustancia o mezcla de sustancias) que ha sido aislado y purificado a partir de fuentes naturales por procesos químicos.²

Producto natural: Producto procesado, industrializado y etiquetado al cual se le atribuyen cualidades medicinales; que contiene en su formulación ingredientes obtenidos de las plantas, animales, minerales o mezclas de éstos.²

Los productos que contengan material natural estandarizado, de síntesis química o aislado de material natural como responsable de la actividad farmacológica, no son considerados como productos naturales.²

Tisanas: Preparaciones acuosas de drogas vegetales, deshidratadas, enteras o en partes, convenientemente divididas o trituradas; que se obtienen por infusión o decocción. Las tisanas son productos magistrales preparados en el momento de ser usados.²

Triturados: Fragmentos o trozos de producto natural.²

Concentración: Es el contenido de ingrediente natural o principio activo, expresado en masa o volumen, en unidades del Sistema Internacional de Unidades (SIU) y en función de la forma farmacéutica. ⁶

Dosis: Es la cantidad de un producto natural que debe administrarse a un paciente, en un intervalo de tiempo determinado, para producir el efecto terapéutico deseado. ⁶

Excipiente o vehículo: Sustancia sin acción farmacológica a la concentración utilizada, que determina o modifica la consistencia, forma, volumen o propiedades fisicoquímicas de las preparaciones de productos naturales. ⁶

Ingrediente activo natural: Es toda sustancia o mezcla de sustancias naturales que tengan actividad farmacológica específica. Es sinónimo de principio activo natural. ⁶

Nombre científico: Nombre binario en latín que consiste en dar a cada especie animal o vegetal, un nombre formado por género y especie, así como la abreviatura actualizada de la persona que nombró esta especie por primera vez, cuando sea conocida. ⁶

Nombre común: Denominación con la cual se conoce popularmente a una planta, animal o mineral en una región determinada. ⁶

Nombre de marca: Nombre que distingue a un determinado producto natural, de propiedad exclusiva de un laboratorio. ⁶

Nombre del producto natural: La denominación puede ser un nombre científico, un nombre común o bien un nombre de marca. Cuando sea un nombre de marca no deberá prestarse a confusión con la denominación científica. ⁶

Material natural estandarizado: Extracto seco, alcohólico o acuoso que contiene una sustancia o una mezcla de éstas, que ha sido aislado y purificado a partir de fuentes naturales por procesos químicos, físicos y biológicos y que se puede cuantificar contra un estándar. ⁶

Producto terminado: Es el que está en su envase o empaque definitivo, etiquetado y listo para ser distribuido y comercializado. ⁶

Vía de administración: Ruta mediante la cual se pone el producto natural en contacto con el ser humano receptor para que pueda ejercer acción local o acción sistémica.⁶

Fitomedicamento: El medicamento es al fármaco lo mismo que el Fitomedicamento al fitofármaco, ya que el medicamento tiene preparaciones anexas (como excipientes) aparte de la preparación. Las modificaciones pueden ser solo de purificación o combinarlo con otro extracto, pero si se agrega otro componente alopático no es considerado fitofármaco. Puede tener diversas presentaciones farmacéuticas (grageas, capsulas, jarabes, comprimidos, tinturas).⁸

Jarabes.

Son preparaciones acuosas, límpidas y de elevada viscosidad, que contienen un azúcar, generalmente sacarosa, en concentración similar a la de saturación. Si el agente edulcorante es la sacarosa, la densidad del jarabe es 1.313 a 15- 20 °C; El punto de ebullición 105 °C y el contenido de sacarosa 64- 65% (p/p), que corresponde aproximadamente a 2/3 de sacarosa y 1/3 de agua. En caso de llevar glucosa; ½ glucosa, ½ agua.¹⁴

Los jarabes son apropiados para la administración de fármacos hidrosolubles. Así mismo por no contener alcohol(o contenerlo en baja cantidad) y por su sabor agradable, son formas líquidas orales de amplia difusión en pediatría.¹⁴

Componentes de los jarabes:

Azúcar, agua purificada, conservantes antimicrobianos, co-disolventes, saborizantes y otras sustancias auxiliares como espesantes, estabilizantes y colorantes.¹⁴

Métodos de Obtención:

En frío: Existen tres procedimientos para disolver el azúcar:

- Mediante Agitación
- Percolación
- Ensacarolizador.¹⁴



En caliente: La aplicación de calor facilita la disolución del azúcar y permite obtener jarabes de forma más rápida que en frío.¹⁴

Guayaba.

Nombre: Guayaba

Nombre científico: Psidium guajava L.

Familia: Myrtaceae

Nombres comunes: Guayabo, Guayabos, Guayaba, Guayabas, Guayabero, Guave (alemán).

Partes Utilizados: Hoja, fruto.

Origen y Características Botánicas:

Etimología: Deriva «psidion», granada, por la aparente semejanza entre los frutos. Árbol pequeño o arbusto. No suele superar los 5 m de altura. Tronco con corteza escamosa de color marrón grisáceo. Tiene ramillas cuadrangulares. Hojas coriáceas, opuestas, de oblongo-elípticas a ovadas-enteras, de 7-15 cm de longitud. Envés pubescente y nerviación destacada, con 10-20 pares de nervios laterales. Flores blancas, axilares, solitarias o en pequeños grupos, de unos 2,5 cm de diámetro, sobre pedúnculos delgados. Fruto esférico, ovoide o piriforme de 3-10 cm de diámetro, amarillo con la pulpa blanca, rosada, o rojiza, algo ácida con olor a almizcle. Según las diversas variedades, la guayaba puede tener forma redondeada semejante a un limón o parecida a una pera. Su cáscara es cerosa; en algunas variedades de piel lisa, otras rugosa y de un color, de verde a amarillento según la especie y su grado de maduración. Bajo la cáscara se encuentra una primera capa de pulpa, consistente y firme. La capa interior es más blanda, jugosa y cremosa albergando un gran número de semillas de constitución leñosa y dura.⁹

Composición química.

Toda la planta es rica en taninos elágicos. La hoja contiene, además, un aceite esencial rico en cariofileno, nerolidiol, b-bisaboleno, aromadendreno, p-selineno, 1,8-cineol y a-pineno y flavonoides derivados de quercetina como guayaverina y avicularina (Cáceres 1996). Otros compuestos tales como b-sitosterol, triterpenoides: ácido oleánico, ursólico, catecólico y guayavólico, ácido maslínico y elágico están presentes en esta parte de la planta. El fruto es rico en vitamina C (Tramil 1998), B1 y B2 (Gupta 1995).⁹

Propiedades farmacológicas

Antidiarreico/astringente: Por su contenido de taninos y su actividad astringente es efectiva en el tratamiento de diarrea, indigestión y espasmo abdominal. La actividad antidiarreica se atribuye a las quercetinas presentes en las hojas y corteza, que tienen una definitiva acción antisecretoria en la liberación de acetilcolina e inhibidora del peristaltismo intestinal, que no es reversible por naxalone; este efecto se debe al bloqueo de los canales de calcio o a la inhibición del sistema enzimático responsable de la síntesis de prostaglandinas, que se relacionan con la liberación de acetilcolina (Lutterodt 1989).⁹

Antimicrobiano: Algunos estudios mostraron que la Guayaba tiene actividad antibacteriana, anticándida y tricomocida (Cáceres 1996). La actividad antibacteriana se atribuye a los flavonoides avicularina, guayaverina y quercetina (Bérdy 1982).⁹

Toxicología, efectos adversos, indeseables y contraindicaciones.

El extracto metanólico, en concentración de 5 mg / placa tiene actividad antimutagénica en modelos de Salmonella typhymurium TA-98 y Escherichia coli WP-2, contra la toxicidad inducida por radiaciones ultravioletas y mutágenos experimentales variados (Jain 1987).
*(Recomendaciones de Tramil, 1998): Para todos los usos internos de partes que no sean el fruto, no prolongar su uso durante más de 30 días consecutivos, no emplearlos en embarazadas y púerperas durante el período de lactancia materna, ni en niños pequeños).⁹



Preparación del jarabe de guayaba a partir del extracto:

Las fuentes útiles de extracto de guayaba incluyen extractos de diversas partes de la planta *Psidium guajava* L., incluyendo la fruta, hojas, tallos, y raíces de la misma. Preferiblemente, el extracto de guayaba se obtiene de hojas de guayaba.¹⁰

El extracto de guayaba se puede obtener a través de un proceso de extracción con disolventes, en el que al menos una porción de la planta de guayaba se pone en contacto con un líquido que incluye, por ejemplo, un disolvente orgánico (por ejemplo, metanol, etanol, butanol e isopropanol), agua (por ejemplo, agua del grifo, agua a temperatura ambiente, agua a temperatura elevada (por ejemplo, agua hirviendo), y sus combinaciones), aceite (por ejemplo, aceite mineral, aceite a temperatura elevada, aceites vegetales, aceites animales, y sus combinaciones), y sus combinaciones. El extracto resultante se reúne entonces para su uso.¹⁰

La planta de guayaba o una porción de la misma también se pueden tratar antes de la extracción. Los tratamientos útiles incluyen, por ejemplo, secado, liofilización, secado por congelación, humidificación, y sus combinaciones.¹⁰

Los vehículos útiles para el extracto de guayaba incluyen, por ejemplo, excipientes, diluyentes, aglutinantes, lubricantes, disgregantes, agentes colorantes, agentes edulcorantes, y sus combinaciones, incluyendo, por ejemplo, hidratos de carbono, ceras, polímeros solubles y/o hinchables en agua, materiales hidrófilos, materiales hidrófobos, gelatina, aceites, disolventes orgánicos, agua, y sus combinaciones. La selección del vehículo dependerá del medio mediante el cual se administrará el extracto de guayaba.¹⁰

La dosis de extracto de guayaba puede incluir opcionalmente agentes humectantes, agentes lubricantes, emulsionantes, agentes de suspensión, conservantes, edulcorantes, estabilizantes, agentes saborizantes, agentes colorantes.¹⁰

Indicaciones terapéuticas, Preparación y Posología.

Indicación Preparación Posología Duración
Diarreas infecciosas. Amebas, Giardiasis, Uncinariasis, Tricoce-falosis, Oxiuriasis
Decocción: Preparar el cocimiento de 10 cucharadas de hoja picata seca de Guayaba en 1 litro de agua; colar y adicionarle suero oral. Administrar 3 veces al día. 7 días.⁹

Tabla de Indicación, Preparación, Posología y Duración del tratamiento con hojas de Psidium Guayaba.

Indicación	Preparación	Posología	Duración
Diarreas infecciosas Amebas, Giardiasis, uniciariasis, tricocefalosis, oxuriasis.	Decocción: preparar el cocimiento de 10 hojas picadas y secas de guayaba en un litro de agua; calor y adicionarle suero oral	Administrar 3 veces al día.	7 días.

Fuente: <http://isnaya.webseiten.cc/index.php?id=94>

Buenas Prácticas de Manufactura de Fitofármacos.

Las buenas prácticas de manufactura son pautas universales aplicadas en la producción farmacéutica. Los fitofármacos no tienen consideraciones especiales, pero existen algunas peculiaridades en el complejo de la producción y del control de calidad de los mismos.¹

Las Especificaciones de calidad de la materia prima vegetal deben contemplar:

- Nombre botánico.
- Detalles de la fuente de la planta (lugar de origen, fecha de cosecha, método de cosecha, pesticidas empleados, etc.).
- Parte de la planta utilizada.
- En caso de planta seca, debe especificarse el sistema de secado.
- Descripción macro y micromorfológica.

- Ensayo de identificación, en el caso que sea posible, de los ingredientes activos o marcadores.
- Evaluación de los componentes de actividad terapéutica conocida o de marcadores.
- Métodos para determinar la posible contaminación con pesticidas y límites aceptables.
- Ensayos para la determinación de contaminación microbiana, incluyendo aflatoxinas e infestación por plagas y límites aceptados.
- Ensayos de metales pesados y adulterantes. ¹

Infiltración Microbiológica.

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. ¹

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, también el empleo de agua no apta microbiológicamente. ¹

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. ¹

Por tal motivo los problemas de contaminación y consecuentemente las pérdidas de materias primas vegetales han ido en aumento, por lo que la estrategia para solucionar dicha problemática debe tomar en consideración entre las soluciones propuestas la desinfección de las plantas mediante métodos aprobados por la OMS. ¹

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. ¹

Contaminación microbiana por el envase: En el proceso de envasado es necesario asegurarse que los envases no presenten carga microbiana, aun 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 a todo material dispuesto a ser usado para el envasado de los productos. ¹

Contaminación microbiana por las condiciones de almacenamiento, El producto terminado debe almacenarse en condiciones óptimas de temperatura y humedad controlada. ¹

En Control microbiológico 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. ¹

Las Técnicas de Análisis del Producto a emplearse en el análisis de control de calidad, deberán ser reproducibles, estar validadas y ser ejecutadas por personal capacitado e idóneo para la ejecución de los ensayos. ¹

Microorganismos:

Escherichia coli.

Escherichia coli forma parte de la familia Enterobacteriaceae a la cual pertenecen otros patógenos importantes como *Shigellas* y *Salmonellas*. Son bacilos gram-negativos, no esporulados, la mayoría móviles aunque también puede haber variantes no móviles. Crecen en medios de cultivos simples de peptona o extracto de carne sin ningún suplemento, o medios selectivos como el Agar MacConkey, las colonias presentan coloración rojo ladrillo y pueden estar rodeadas por una zona de bilis precipitada.⁷

Son anaerobios facultativos, fermentan la glucosa con producción de ácido o ácido y gas, son catalasa positiva y oxidasa negativo y reducen los nitratos a nitritos. Forman parte de la microbiota intestinal normal de humanos, animales y se aíslan del medio ambiente. Algunas cepas de *Escherichia coli* son patógenas para el hombre y los animales.⁷

Salmonella spp.

El género *Salmonella spp* pertenece a las enterobacterias y como tales son bacilos gramnegativos que fermentan la glucosa, no fermentan la lactosa ni la sacarosa, son anaerobias facultativas, la mayoría móviles con flagelos peritricos, no producen indol y suelen producir sulfuro de hidrógeno. Son bacterias de crecimiento rápido, crecen en medios diferenciales como MacConkey y en los altamente selectivos como Agar *Salmonella Shigella*, así como en medios altamente inhibidores como Selenito.

La principal forma de transmisión es a través de los alimentos. De las formas clínicas, las más comunes son la fiebre tifoidea y paratifoidea producidas por *Salmonella Typhi* y *Paratyphy A*. De las asociadas a infección del torrente sanguíneo, uno de los serotipos más comunes es *Salmonella Choleraesuis*. Sin embargo, la forma clínica más frecuente es la diarrea asociada a más de 1,500 serotipos. Estos procesos requieren manejo terapéutico distinto por tener morbi-mortalidad distinta.⁷



Pseudomona aeruginosa.

El género *Pseudomona* está constituido por bacilos gram negativos aerobios que no forman esporas y son rectos o ligeramente curvos, miden de 1.5 a 5 mm de largo y 0.5 a 1.0 mm de ancho.

Las *Pseudomonas* spp son móviles debido a la presencia de uno o más flagelos polares. Los aislamientos obtenidos de muestras clínicas son oxidasa y catalasa positiva y crecen en Agar MacConkey como UFC no fermentadoras de lactosa. La mayoría de las especies degradan la glucosa oxidativamente y reducen nitratos a gas nitrógeno.

Las colonias son usualmente extendidas y planas, tienen bordes irregulares y un brillo metálico característico, el cual es frecuentemente asociado con la autólisis de las colonias.

Existen otras variantes de colonias incluyendo formas lisas, gelatinosas y mucoides la *Pseudomona aeruginosa* produce varios pigmentos solubles en agua, como el pigmento verde amarillento fluorescente llamado pioverdina (también producida por *P. fluorescens* y *P. putida*). Cuando la pioverdina se combina con un pigmento azul hidrosoluble, pigmento fenazina, se produce piocianina, un color azul turquesa-verde brillante característico de *P. aeruginosa*. Unas pocas cepas de *Pseudomona aeruginosa* pueden producir pigmentos de otros colores como piourubrina (rojo) o piomelanina (marrón a negro).

La *Pseudomona aeruginosa* puede ser identificada sobre la base de la prueba de oxidasa, TSI, crecimiento a 42 °C y producción de pigmentos ya sea fluorescente, azul verde, rojo o café en Agar Mueller Hinton.

Algunas cepas de *Pseudomona aeruginosa* producen solo pioverdina (verde amarillo fluorescente) característica que comparte con *P. fluorescens* y *P. putida* pero la habilidad de *P. aeruginosa* de crecer a 42 °C la distingue de las otras dos especies; *P. fluorescens* puede ser diferenciada de *P. putida* basándose en su habilidad de degradar la gelatina.⁷



Staphylococcus aureus

Los *estafilococos* son células esféricas de alrededor de 1 µm de diámetro, gram positivas generalmente agrupadas en racimos. En cultivos líquidos se observan además cocos aislados, en pares, tétradas y cadenas. Son microorganismos no móviles y no forman esporas.

Los *estafilococos* crecen con facilidad en la mayor parte de los medios de cultivos y son activos desde el punto de vista metabólico, fermentan muchos carbohidratos y producen pigmentos que varían desde el color blanco hasta el amarillo intenso bajo condiciones aerobias o microaerófilas. Crecen con mayor rapidez a 37 °C, pero forman mejor el pigmento a temperatura entre 20 -25 °C. Las colonias desarrolladas en medios sólidos son redondas, lisas, elevadas y resplandecientes. *S. aureus* forma colonias de color gris a amarillo dorado intenso. Las colonias de *S. epidermidis* tienen tonos de grises a blancas.

Los *estafilococos* producen catalasa, lo que los distingue de los *estreptococos*. Los *estafilococos* patógenos generalmente son hemolíticos y coagulan el plasma. Algunos son miembros de la microbiota normal de la piel y mucosas de los humanos, en tanto que otros producen supuración, formación de abscesos, diversas infecciones piógenas e incluso septicemia mortal. Un tipo común de envenenamiento por alimentos es causado por una enterotoxina termoestable producida por algunas cepas de *estafilococos*.

El género *Staphylococcus* tiene por lo menos 20 especies, el *Staphylococcus aureus* es un microorganismo patógeno de gran importancia para el ser humano por ser el causante de muchas infecciones graves.

Entre el 20 al 40 % de los adultos suelen portarlo en las narinas, también se le encuentra en otros sitios como pliegues cutáneos, periné, axilas y vagina. Aunque este microorganismo suele formar parte de la microbiota humana normal, puede producir infecciones oportunistas en huéspedes susceptibles. Los *estafilococos* coagulasa negativos también constituyen parte de la microbiota humana normal.



Staphylococcus epidermidis es el microorganismo recuperado con mayor frecuencia: entre el 50% y 80% de los aislamientos de esta especie se incluyen, endocarditis originada en válvulas cardiacas naturales y protésicas, infecciones producidas por catéteres intravenosos, infecciones de sistemas para derivaciones del LCR, peritonitis asociada con catéteres para diálisis peritoneal, bacteriemia, osteomielitis, infecciones de heridas, infecciones de injertos vasculares, infecciones de prótesis articulares e infecciones de las vías urinarias. *Staphylococcus saprophyticus* es la segunda causa de infección del tracto urinario en mujeres jóvenes no embarazadas.⁷

Clostridium

Las bacterias del género *Clostridium* son bacilos Gram positivos, anaerobios y sulfitorreductores. Producen esporas excepcionalmente resistentes a las condiciones desfavorables en medios acuáticos, incluidas la irradiación UV, los extremos de temperatura y pH, y los procesos de desinfección, como la cloración. La especie característica del género, *C. perfringens*, forma parte de la microflora intestinal normal de entre el 13 y el 35% de las personas y otros animales de sangre caliente, aunque este género también incluye otras especies cuyo origen no es exclusivamente fecal. Al igual que *E. coli*, *C. perfringens* no prolifera en la mayoría de los medios acuáticos, por lo que es un indicador de contaminación fecal muy específico.

Clostridium perfringens y sus esporas están presentes prácticamente siempre en aguas residuales; no obstante, el microorganismo no prolifera en medios acuáticos. *Clostridium perfringens* está presente con más frecuencia y en mayores concentraciones en las heces de algunos animales, como los perros, que en las heces humanas, y con menos frecuencia en las heces de muchos otros animales de sangre caliente. La cantidad excretada en las heces es, por lo general, substancialmente menor que la de *E. coli*.

Las esporas y células vegetativas de *C. perfringens* suelen detectarse mediante técnicas de filtración con membrana y posterior incubación de las membranas en medios selectivos en condiciones estrictamente anaerobias.³

Shigella.

El género *Shigella* pertenece a la Tribu *Escherichiae* de la Familia Enterobacteriaceae y como tales son bacilos Gram negativos que fermentan la glucosa, no fermentan la lactosa excepto *Shigella sonnei* que lo hace lentamente; son anaerobios facultativos no esporulados, no presentan cápsula y son inmóviles ya que no poseen flagelos. Son bacterias de crecimiento rápido en medios de baja selectividad como Agar MacConkey y en medios altamente selectivos como Agar Salmonella Shigella excepto algunas cepas de *Shigella dysenteriae* serotipo 1 que pueden ser inhibidas en su crecimiento. Proliferan bien en medios de enriquecimiento altamente inhibidores como selenito.

El género *Shigella* está constituido por cuatro especies *dysenteriae* (serogrupo A), *flexneri* (serogrupo B), *boydii* (serogrupo C) y *sonnei* (serogrupo D). Dentro de la especie *dysenteriae*, se agrupan 13 serotipos del 1 al 13, con mayor importancia clínica el serotipo 1 causante de disentería bacilar. Esta especie tiene la particularidad de no fermentar el manitol y además:

1. Ausencia de catalasa, contraria a las demás Enterobacterias.
2. Posee una enzima β -galactosidasa muy activa (prueba de ONPG rápidamente positiva, en menos de una hora).

Shigella dysenteriae 6 a diferencia de *S. dysenteriae* 1 es ONPG lenta (18 horas). Dentro de la especie *flexneri* se agrupan 6 serotipos del 1 al 6. Así mismo dentro de los serotipos 2 y 3 se agrupan subtipos a y b que son variaciones menores ligadas a conversión bacteriofágica (se refiere a fagos, cierto tipo de virus que infectan bacterias y que son útiles para clasificarlas) realizada sólo en laboratorios especializados.

El serotipo de *Shigella flexneri* 6 posee variedades bioquímicas que producen poco gas a partir de la glucosa en el sitio de inoculación del agar inclinado Triple Sugar Agar o Kligler Iron Agar. Estas variedades son: Boyd 88, Manchester y Newcastle.⁷



Medios de cultivo.

Agar EMB (eosina, azul de metileno, “eosin-methylenblue”, Agar de Levine)

Es un medio diferencial y selectivo para aislar y detectar enterobacterias en muestras mixtas. Los colorantes de anilina (eosina y azul de metileno) inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y a las Gram negativas exigentes. También se combinan precipitando a pH ácido, actuando como indicadores de producción de ácidos. El medio incluye lactosa, lo que permite la diferenciación de los fermentadores de lactosa de los no fermentadores. Los fermentadores fuertes de lactosa, sobre todo *Escherichia coli*, producen colonias de color negro verdoso con brillo metálico. Los productores más débiles de ácidos, forman colonias de color violeta. Los no fermentadores de lactosa forman colonias transparentes.¹²

Agar glucosa de Sabouraud

Este medio fue desarrollado para el cultivo de hongos patógenos, especialmente de los productores de micosis superficiales. En la actualidad se recomienda sólo para el aislamiento primario de dermatofitos, con el agregado de cicloheximida y cloranfenicol. El pH final (alrededor de 5,6) es mucho menor que el de la mayoría de los medios y tiende a eliminar el crecimiento bacteriano. Los sub-cultivos de los hongos aislados originalmente en BHI pueden presentar una morfología más uniforme en agar glucosa de Sabouraud, por esto es útil para la identificación de hongos una vez aislados.¹²

Agar HE (agar entérico de Hektoen)

Este medio es un ejemplo de agar selectivo y diferencial que no necesita ser esterilizado en autoclave porque son muy pocos los microorganismos que pueden crecer en él. Las concentraciones de sales biliares y de los colorantes azul de bromotimol y fucsina ácida son lo suficientemente altas como para inhibir el desarrollo de la mayoría de la microbiota fecal normal. Está indicado para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*.

Como elementos diferenciadores se incorporan lactosa, sacarosa y salicina que no son fermentadas ni por *Salmonella* ni por *Shigella*. Los organismos fermentadores de lactosa, al acidificar el medio alrededor de la colonia, toman un color amarillo. La adición de citrato férrico amónico y tiosulfato sódico permite la visualización del sulfhídrico por la formación de un precipitado negro alrededor de las colonias. Las colonias de *Shigella* son verdes o transparentes, y las de *Salmonella*, verdes o transparentes con un precipitado negro en el centro.¹²

Agar MacConkey

Es un medio selectivo y diferencial utilizado para la recuperación de enterobacterias y bacilos Gram negativos entéricos relacionados. Contiene sales biliares y cristal violeta que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y de algunas Gram negativas exigentes. La lactosa es la única fuente de carbono. El indicador es el rojo neutro. Las bacterias fermentadoras de lactosa forman colonias de diferentes tonos de rojo. Los fermentadores fuertes de lactosa pueden provocar la precipitación de las sales biliares por la gran cantidad de ácidos formados, lo que se observa fácilmente en el medio por la aparición de zonas opacas alrededor de las colonias. Las bacterias que no fermentan la lactosa forman colonias incoloras o transparentes.¹²

Agar SS (*Salmonella-Shigella*)

Lleva sales biliares, citrato sódico y férrico, tiosulfato y el colorante verde brillante. El carácter diferencial se basa en la fermentación de la lactosa. Incorpora rojo neutro. Las colonias lactosa positivas son de color rojo, mientras que las lactosa negativas son transparentes (*Shigella*). Las colonias de *Salmonella* son transparentes con el centro negro.¹²

Agar triptica-soja (TSA)

Medio rico de uso general para el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos. Se produce por digestión enzimática de la soja y de la caseína. Con frecuencia se utiliza como agar base para otros tipos de medios, como agar sangre, por ejemplo. En este medio

pueden crecer algunos microorganismos exigentes como ciertas especies de *Brucella*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Neisseria* y *Vibrio*.¹²

Agar verde brillante

Medio altamente selectivo para el aislamiento de especies de *Salmonella* excepto *S. typhi* y *S. paratyphi*. No se recomienda para el aislamiento de *Shigella*. Incluye lactosa, sacarosa y rojo fenol. El verde brillante es el agente inhibidor. Las colonias de *Salmonella* se ven de color rosa o blanco, o transparentes, sobre un fondo rojo.¹²

Agar XLD (xilosa, lisina, desoxicolato)

Como el agar de Hektoen, este medio es diferencial y selectivo para *Salmonella* y *Shigella*. No necesita ser esterilizado en autoclave. Las sales biliares inhiben a muchas enterobacterias y microorganismos Gram positivos. El indicador rojo fenol permite la diferenciación de los no fermentadores de lactosa (*Salmonella* y *Shigella*) como colonias incoloras (rosa pálido). El citrato de hierro y amonio permite la visualización de microorganismos productores de sulfhídrico como colonias con centros negros. Los microorganismos que fermentan los carbohidratos del medio (xilosa, lactosa y sacarosa) dan lugar a colonias amarillas.¹²

Caldo selenito F

Caldo con selenito sódico que en ocasiones se suplementa con cisteína, diseñado para el enriquecimiento de salmonella. El selenito inhibe el crecimiento de coliformes y enterococos en las primeras 12 horas de incubación mientras que *Proteus* y *Salmonella* no son inhibidos.¹²

Pruebas Bioquímicas.

Producción de Indol:

Si la bacteria posee la enzima triptofanasa, el aminoácido triptófano será degradado en varios productos entre los cuales está el indol, el cual se hace visible al agregarle el reactivo

de Kovac (p-dimetilaminobenzaldehído) o Erlich con un color rosado intenso. Sin la presencia de la enzima y ausencia del indol, el reactivo se ve transparente.⁷

Agar Hierro Tres Azúcares O Triple Azúcares Y Hierro (Tsi):

Este medio se utiliza para determinar la capacidad de los bacilos gramnegativos para fermentar lactosa, sacarosa y glucosa, así como para determinar su capacidad de producir H₂S (ácido sulfhídrico).⁷

1. Fermentación de los Carbohidratos: El medio contiene dos cámaras de reacción, en la parte inclinada se fermenta la sacarosa y la lactosa y en la parte profunda se fermenta la glucosa. Se puede fermentar los 3 carbohidratos o uno de ellos depende de la bacteria que se estudie.

2. Producción de Sulfuro de Hidrógeno: Si la bacteria tiene la enzima tiosulfatasa, reacciona con el tiosulfato de Na como una fuente de azufre para la producción del sulfuro de hidrógeno, el cual es incoloro, pero al reaccionar con sales de hierro, en este caso citrato férrico, se produce un precipitado de color negro. Para que esto ocurra debe haber un pH ácido, lo cual se consigue con la fermentación de la glucosa.

3. Producción de Gas: El primer paso es la fermentación de la glucosa, uno de cuyos productos terminales es el ácido fórmico. Si la bacteria tiene la enzima deshidrogenasa fórmica, el ácido fórmico es descompuesto en CO₂ y H₂.⁷

Prueba de oxidasa:

El tetrametil-parafenilendiaminohidrócloruro al 1% se emplea para la determinación de la citocromo oxidasa. Este reactivo sustituye al oxígeno como aceptor de electrones para la respiración bacteriana, proceso que se lleva a cabo en la membrana celular. En su estado reducido es incoloro, pero en presencia de la enzima citocromo oxidasa se oxida formando el azul de indofenol, visible en los primeros 10 segundos de la prueba.⁷

Prueba De Coagulasa:

Es una sustancia similar a la trombina presente en los cultivos capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina, lo que da como resultado la formación de un coágulo visible.

Preparación del plasma diluido 1:5 En un tubo estéril de plástico 15 x 100 se agrega 1 mL de plasma oxalatado o citratado y 4 mL de solución salina 0.85 %. Este plasma diluido al 1:5 se mantiene en congelación en viales estériles de 1 mL en pequeños lotes listos para su uso a 4 °C, Fundamentos bioquímicos de la bacteria: Staphylococcus aureus produce coagulasa, proteína de tipo enzimático que coagula el plasma oxalatado o citratado en presencia de un factor contenido en muchos sueros. Resultado: Positivo: Formación de coágulo.⁷

MATERIAL Y MÉTODO.

Tipo de Estudio: Descriptivo de cohorte transversal.

Área de Estudio: Departamento de Farmacia Industrial, área de Microbiología, facultad de Ciencias Químicas, UNAN- LEÓN.

Universo de trabajo: Jarabes de Guayaba comercializados en centros naturistas de la ciudad de León.

Muestra: Se tomaron al azar diez frascos de jarabe de guayaba en estantes de centros naturistas de la ciudad de León.

Tipo de muestreo: Aleatorio Simple.

Variantes de Interés:

- Conteo total de Aerobios.
- Identificar presencia de microorganismos específicos.

Criterios de Inclusión:

- Jarabes de Guayaba
- Comercializados en la ciudad de León
- Pertenecientes al mismo número lote
- Frasco sellado

Criterios de Exclusión:

- No sea jarabe de Guayaba
- Comercializados fuera de la ciudad de León
- Diferente número de lote de producción
- Frasco que presente alguna alteración.

Materiales:

Medios de Cultivo:

- Caldo de Enriquecimiento Verde de Malaquita
- Caldo Selenito
- Caldo MacConkey
- Caldo Lactosado
- Caldo Tripticasoya
- Buffer Cloruro de Sodio Peptona
- Buffer Fosfato
- Agar Cetrimide
- Agar Baird –parker
- Agar Levine
- Agar Hecktoen
- Agar MacConkey
- Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD)
- Agar Salmonella-Shigella
- Agar Sabouraud
- Agar Tripticasoya
- Medio SPS doble concentrado (Agar Sulfito-Polimixina Sulfadiaxina)).

Método.

A. Conteo total de Aerobios.

Pre tratamiento de la muestra: Se elaboró un pool tomando 50 mL de cada uno de los diez jarabes al cual se le agregó Lecitina de Soya, el cual se homogenizó y se dejó reposar por unos minutos. Luego se procedió a realizar diluciones en buffer fosfato pH 7.2 hasta alcanzar las siguientes concentraciones 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} . (Ver esquema 1)

Recuento en placa.

Para bacterias.

Se utilizaron placas de Petri de 9-10 cm de diámetro. Se agregó a cada placa un 1 ml de cada dilución a unos 18 ml de licuado de *medio agar tripticasoya* a una temperatura no superior a 45 °C. Se esparció el material en la superficie del medio en la placa Petri. Se prepararon dos placas con la misma dilución, se colocaron de manera invertida y se incubaron a 37 °C durante 72 horas. Se contó el número de colonias formadas y se calculó el promedio de los resultados con la placa que contenía el mayor número de colonias. (Ver esquema 1)

Para hongos y levaduras.

Se utilizaron placas de Petri de 9-10 cm de diámetro. Se agregó a cada placa un 1 ml de cada dilución a unos 18 ml de licuado de *medio agar sabouraud dextrosa* a una temperatura no superior a 45 °C. Se difundió el material previamente tratado en la superficie del medio en una placa Petri. Se prepararon dos platos con la misma dilución e incubaron en posición invertida a 25 °C durante 5 días. Se contó el número de colonias formadas y se calcularon los resultados utilizando el plato que no contenía más de 100 colonias. (Ver esquema 1)

- Se dejaron placas de control de ambiente y esterilidad del medio.

B. Identificación presencia de microorganismos específicos.

1. Escherichia coli.

Se Trasfirió 10 mL de jarabe homogenizado del pool a 90 mL de *Caldo Lactosado*. Se incubó a 37 °C por 48 horas, posteriormente se tomó 1 ml del material y se llevó a 100 ml de *Caldo MacConkey*. Se incubó a 37 °C por 24 horas. Se prepararon 2 sub-cultivos en placas con *Agar Levine* y se incubaron a 37 °C por 24 horas. (Ver esquema 2)

2. *Salmonella spp.*

Se Trasfirió 1 ml del cultivo pre-enriquecido en *Caldo Lactosado* a 100 ml de *Caldo Selenito*. Se incubó a 37 °C por 24 horas. Se depositaron 3 asas en 2 placas con medio selectivo de *Hecktoen*. Se Incubó a 37 °C por 48 horas. (Ver esquema 2)

3. *Pseudomona aeruginosa.*

Se Trasfirió 10 mL de jarabe homogenizado del pool a solución buffer cloruro de sodio -peptona, pH 7.0. Se incubó a 37 °C por 48 horas. Se llevó 1 mL del material pre-tratado a 100 ml de *Medio de Enriquecimiento Verde de malaquita*. Se homogenizó e incubó a 37 °C por 48 horas. Se llevó a un sub-cultivo en 2 placas Petri conteniendo *Agar Cetrimide*. Se incubó a 37 °C por 24 horas. (Ver esquema 3)

4. *Staphylococcus aureus*

Se tomó 1 mL de la solución de Buffer de Cloruro de sodio -Peptona, pH 7.0 Se inoculó en 100 ml de *Medio Tripticsoya*, Se homogenizó y luego fue incubado a 37 °C por 48 horas. Se prepararon dos sub-cultivos en *Medio Agar Baird-Parker*, incubándose a 37 ° C por 24 horas. (Ver esquema 3)

5. *Clostridium spp.*

Se depositó 1 ml de la muestra de jarabe en un tubo que contenía 10 ml de medio SPS doble concentrado (Agar Sulfito-Polimixina Sulfadiazina), posteriormente se homogenizó el medio junto con la muestra, se dejó solidificar y se selló con parafina líquida estéril. Se incubó a 37 ° C por 5 días. (Ver esquema 4)

6. *Shigella*

Inoculación Directa en platos con agar. Se tomaron 3 muestras, tomadas con el asa del jarabe. Se inoculó en *agar MacConkey*, *Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato* y *Agar Salmonella- Shigella*. Se incubaron las placas a 37 °C por 48 Horas. (Ver esquema 5)

Todo esto se realizó por triplicado.



RESULTADOS

A. Conteo total de Aerobios viable.

1. El conteo promedio de los tres ensayos realizado en placas para Bacterias Aerobias Mesófilas dio como resultado, para el conteo de Bacterias Aerobias Mesófilas, dilución de 10^{-1} , una cantidad promedio de 30 ufc/ml, en las diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} no se encontró crecimiento de colonias. El Control del Medio Ambiente presentó aparición de dos colonias de microorganismos.
2. Para el conteo de Hongos y Levaduras, no se encontró crecimiento alguno en las placas en los tres ensayos realizados de igual forma el Control del Medio Ambiente no presentó aparición de microorganismos. (Ver tabla 4,5)

B. Identificación de microorganismos específicos.

1. *Escherichia coli*: de la muestra pre-enriquecida con *caldo lactosado*, en los tres ensayos, se pudo observar ligera turbidez, llevándose a *caldo MacConkey* en donde no mostro turbidez alguna, la siembra en *agar Levine* confirmo la ausencia de ésta en la muestra. La claridad y el no crecimiento en los medios de cultivo demostraron la ausencia del patógeno en la muestra. (Ver tabla 5)
2. *Salmonella spp*: en la muestra pre-enriquecida con *caldo Lactosado*, ésta presentó ligera turbidez, Llevándose a *caldo selenito cistina* donde no hubo signo de contaminación microbiana en ninguno de los tres ensayos, ya que el medio no presento turbidez alguna. El cultivo en *agar Hecktoen* confirmó la ausencia de ésta. La claridad del *selenito cistina* y el no crecimiento en los medios de *agar Hecktoen* demostró la ausencia del patógeno en la muestra. (Ver tabla 5)

3. *Pseudomona aeruginosa*: de la muestra tomada del *buffer cloruro de sodio- peptona* llevado a *medio verde de malaquita* no presento turbidez alguna, Luego en el cultivo en *agar cetrimide*, se pudo constatar que la *Pseudomona aeruginosa* se encuentra ausente puesto que no hubo crecimiento alguno en el agar. Con esto se demuestra la ausencia del patógeno en la muestra en los tres ensayos realizados. (Ver tabla 5)
4. *Staphylococcus aureus*: la muestra pre tratada en *buffer cloruro de sodio- peptona*, no presentó turbidez, el *Caldo digerido Trypticasoya* presentó ligera turbidez, en el cultivo realizado en Agar Baird-parker presentó crecimiento de colonias color crema, planas y abundantes en una placa, en la otras placas no hubo crecimiento alguno. Se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes para poder identificar el microorganismo presente en dicha placa ya que no poseía las características de ser *Staphylococcus aureus*, que luego de haber realizado las pruebas bioquímicas correspondientes se determinó que se trataba de *Basilus subtilis*, una especie de la flora normal que se pudo infiltrar durante el cultivo. (Ver tabla 5)
5. *Shigella spp*: En la inoculación directa que se realizó a partir del jarabe en los tres ensayos, en *Agar MacConkey*, No hubo crecimiento de ningún tipo de colonias; en *Agar Salmonella-Shigella (SS)*, No hubo crecimiento; *agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD)*: no hubo crecimiento. La ausencia de crecimiento y la no reacción de los indicadores de los agares selectivos demuestran la ausencia del patógeno en la muestra. (Ver tabla 5)
6. *Clostridium spp*: En la siembra que se realizó en medio SPS doble concentrado (Agar Sulfito-Polimixina Sulfadiaxina), No hubo crecimiento microbiano en ninguno de los ensayos, lo cual demuestra la ausencia de éste. La siembra de *Clostridium* en el medio de cultivo en SPS doble concentrado demostró la ausencia del patógeno al no presentar las características propias del mismo en el medio de cultivo. (Ver tabla 5)



DISCUSIÓN

El presente estudio cuantificó la cantidad total de microorganismos aerobios viables presentes en la muestra la cual fue de 30 UFC/ ml. Las especificaciones para el recuento total de anaerobios viables que exige el Reglamento Técnico Centroamericano son de no más de 10^4 UFC/ ml. ² El presente estudio mostró la ausencia de hongos y levaduras. La especificación para hongos y levaduras establecida por el Reglamento Técnico Centroamericano es de no más de 10^2 UFC/ml. ²

Las pruebas para la identificación de microorganismos específicos mostraron la Ausencia de *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium spp*, *Shigella spp* en la muestra. Las especificaciones que establece la OMS, “Directrices para evaluar la calidad de las hierbas medicinales en relación con los contaminantes y residuos; determinación de microorganismos” son la Ausencia total de estos patógenos. ¹¹ El “Reglamento Técnico Centroamericano, de productos Naturales de uso Humano, verificación de la calidad” establece para *Pseudomona aeruginosa* una cantidad igual o menor de 10^2 UFC/mL y la usencia total de *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*. ²

CONCLUSIÓN

La cantidad de microorganismos aerobios viables encontrados en la muestra de jarabes de guayaba cumple con las especificaciones de la OMS, “Directrices para evaluar la calidad de las hiervas medicinales en relación con los contaminantes y residuos; determinación de microorganismos”, y del “Reglamento Técnico Centroamericano de productos Naturales de uso Humano, verificación de la calidad”, por estar dentro de los límites permitidos.^{2, 11}

La ausencia de *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium spp*, *Shigella spp* en la muestra de jarabes de guayaba cumple con las especificaciones de la OMS, “Directrices para evaluar la calidad de las hiervas medicinales en relación con los contaminantes y residuos; determinación de microorganismos”, y del “Reglamento Técnico Centroamericano de productos Naturales de uso Humano, verificación de la calidad”.^{2, 11}

Se demuestra que los jarabes de guayaba (*Psidium spp.*) comercializados en la ciudad de León en el periodo julio - agosto del 2011 cumplen con los límites microbiológicos establecidos por la OMS, “Directrices para evaluar la calidad de las hiervas medicinales en relación con los contaminantes y residuos; determinación de microorganismos”, y del “Reglamento Técnico Centroamericano de productos Naturales de uso Humano, verificación de la calidad”.^{2, 11}

El cumplimiento de las normas establecidas por la OMS, “Directrices para evaluar la calidad de las hiervas medicinales en relación con los contaminantes y residuos; determinación de microorganismos”, y del “Reglamento Técnico Centroamericano de productos Naturales de uso Humano, verificación de la calidad”.^{2, 11} demuestra que el fitofármaco es seguro para ser consumido, de manera que este no le provocará daño por contaminación microbiana al paciente.

RECOMENDACIONES

- Al ministerio de salud, como ente regulador del control de calidad de medicamentos exija y compruebe la inocuidad de los productos de origen natural.
- La realización de este tipo de estudios a todos los fitofármacos comercializados en el país, para garantizar la inocuidad de estos y sean seguros para el consumo.
- Realizar los ensayos según las normas y referencias vigentes como el Reglamento Técnico Centroamericano, la OMS, USP u otro método que pueda alcanzar los objetivos del ensayo.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Ginebra 2003.
2. Reglamento Técnico Centro Americano. Productos farmacéuticos. Productos naturales para uso humano. Verificación de la calidad. RTCA 11.03.56:09
3. http://www.bvsde.paho.org/CD-GDWQ/docs_microbiologicos/Indicadores%20PDF/Clostridium.pdf
4. http://www.bvsde.paho.org/CD-GDWQ/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Shigella.pdf
5. Bolaños López, Lidia del Carmen. Determinación de límite microbiano al Jarabe de cacao (*Cassia grandis* L.) con mayor demanda por la población, comercializado en centros naturistas de la ciudad de León. Enero 2007. página 21.
6. Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.04.41:06. Productos naturales de uso humano. Productos naturales con propiedades medicinales. Etiquetado de productos naturales.
7. Manual de Procedimientos de Bacteriología Médica.
8. <http://www.buenastareas.com/ensayos/Herbolaria/872922.html>
9. <http://isnaya.webseiten.cc/index.php?id=94>
10. <http://patentados.com/patente/metodo-usar-extracto-guayaba-composicion-incluye-extracto/>
11. WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. Annex 5 Determination of microorganisms. Pag. 59
12. Microbiología clínica, medios de cultivo (curso 2010-2011) <http://institucional.us.es/mbclinica/recursos/comunes/medios-cultivo.pdf>
13. Montesdeoca Rodríguez Verónica Geovanna. Elaboración y control de calidad de comprimidos Fitofarmacéuticos de ajeno (*arthemisiaabsinthium l.*), romero (*rosmarinusofficinalis l.*) Y manzanilla (*matricaria chamomilla l.*) Para Combatir la menstruación dolorosa. Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica De

Chimborazo Facultad De Ciencias. Escuela De Bioquímica Y Farmacia. Riobamba-Ecuador.2010.

<http://dspace.esoch.edu.ec/bitstream/123456789/391/1/56T00202.pdf>

14. Villa Jato, José Luis. Tecnología Farmacéutica: Formas Farmacéuticas. Volumen II, páginas 27- 29

ANEXOS

Tabla 1. Características de Staphylococcus aureus en Medios agar específicos:

Medio Agar	Morfología de las Colonias
Baird–Parker	Negras brillantes rodeadas por zonas transparentes de 2 a 5 mm

Tabla 2. Características de Salmonella spp en Medios Agar Específicos:

Medio Agar	Morfología de las Colonias
Xilosa, Lisina, Desoxicolato	Rojas, con o sin centros negros
Entérico de Hektoen	Verde azuladas, con o sin centros negros

Tabla 3. Identificación de las colonias de Shigella en placas.

Medio de Cultivo	Características
MacConkey agar	Colonias convexas, incoloras, 2–3 mm ¹¹
XLD agar	Colonias color rojo, mucosas, 1–2 mm ¹¹
Agar Salmonella-Shigella	Salmonella: colonias transparentes con centro negro. Shigella: Lactosa Positiva color rojo, Lactosa negativa transparentes. ¹²

Tabla 4. Determinación promedio de ensayos y coeficiente de variación.

Datos	Media por Ensayo	Coeficiente de Variación
Primer Ensayo	3 UFC/ mL	0%
Segundo Ensayo	3 UFC/ mL	
Tercer Ensayo	3 UFC/ mL	
Media	3 UFC/mL	

Tabla 5. Cuantificación de Bacterias Aerobias Mesófilas, Hongos y Levaduras, e identificación de microorganismos específicos.

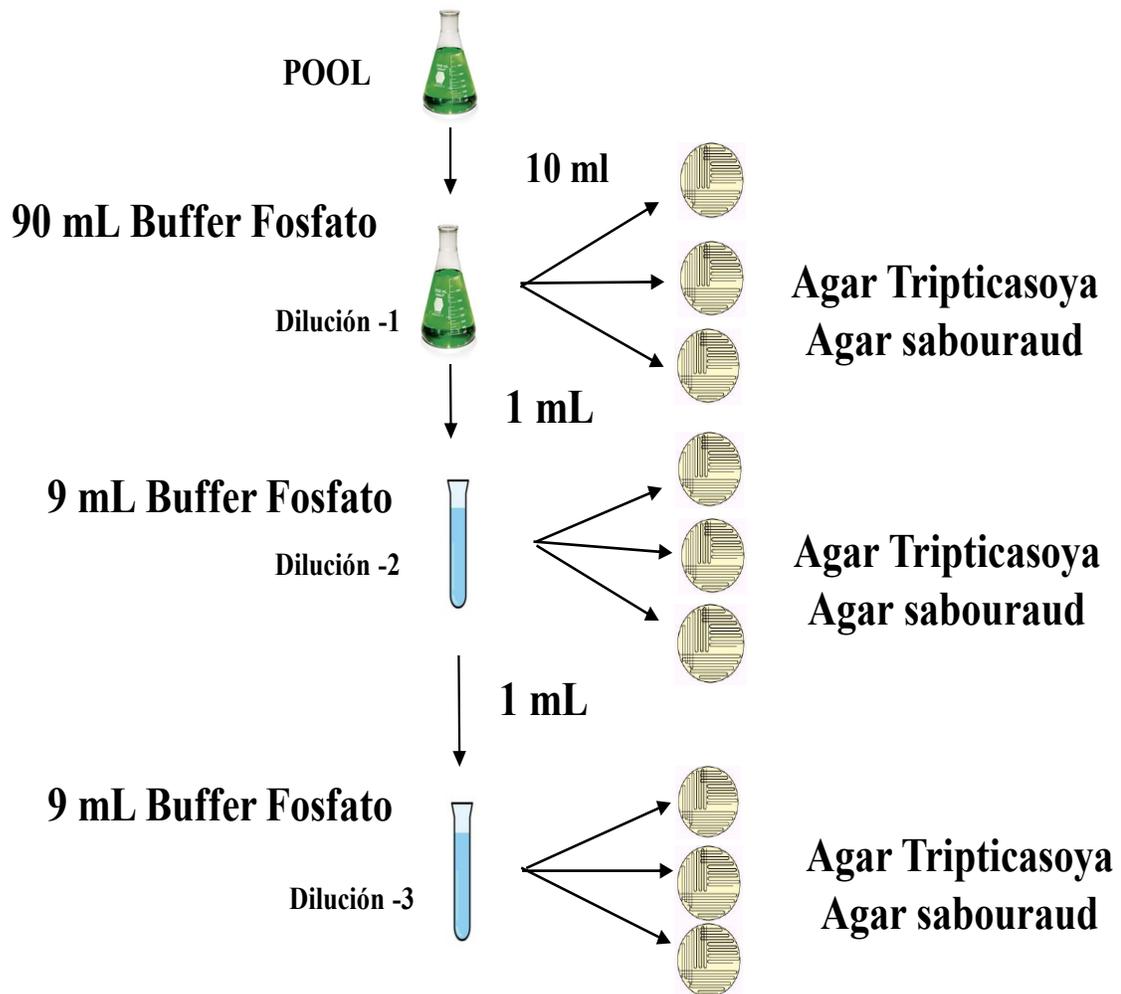
Microorganismos	Resultados	Especificaciones	
		WHO	RTCA
Hongos y Levaduras	0 UFC/mL	$\leq 10^3$ UFC/mL	$\leq 10^2$ UFC/mL
Bacteria aerobias mesófilas	30 UFC/mL	$\leq 10^7$ UFC/mL	$\leq 10^4$ UFC/mL
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausencia	Ausencia	-----
<i>Salmonella spp.</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Shigella spp.</i>	Ausencia	Ausencia	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Clostridium spp.</i>	Ausencia	Ausencia	

Fuentes:

- 1) Reglamento Técnico Centroamericano de productos Naturales de uso Humano, verificación de la calidad.
- 2) WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. Determination of microorganisms

Esquema 1.

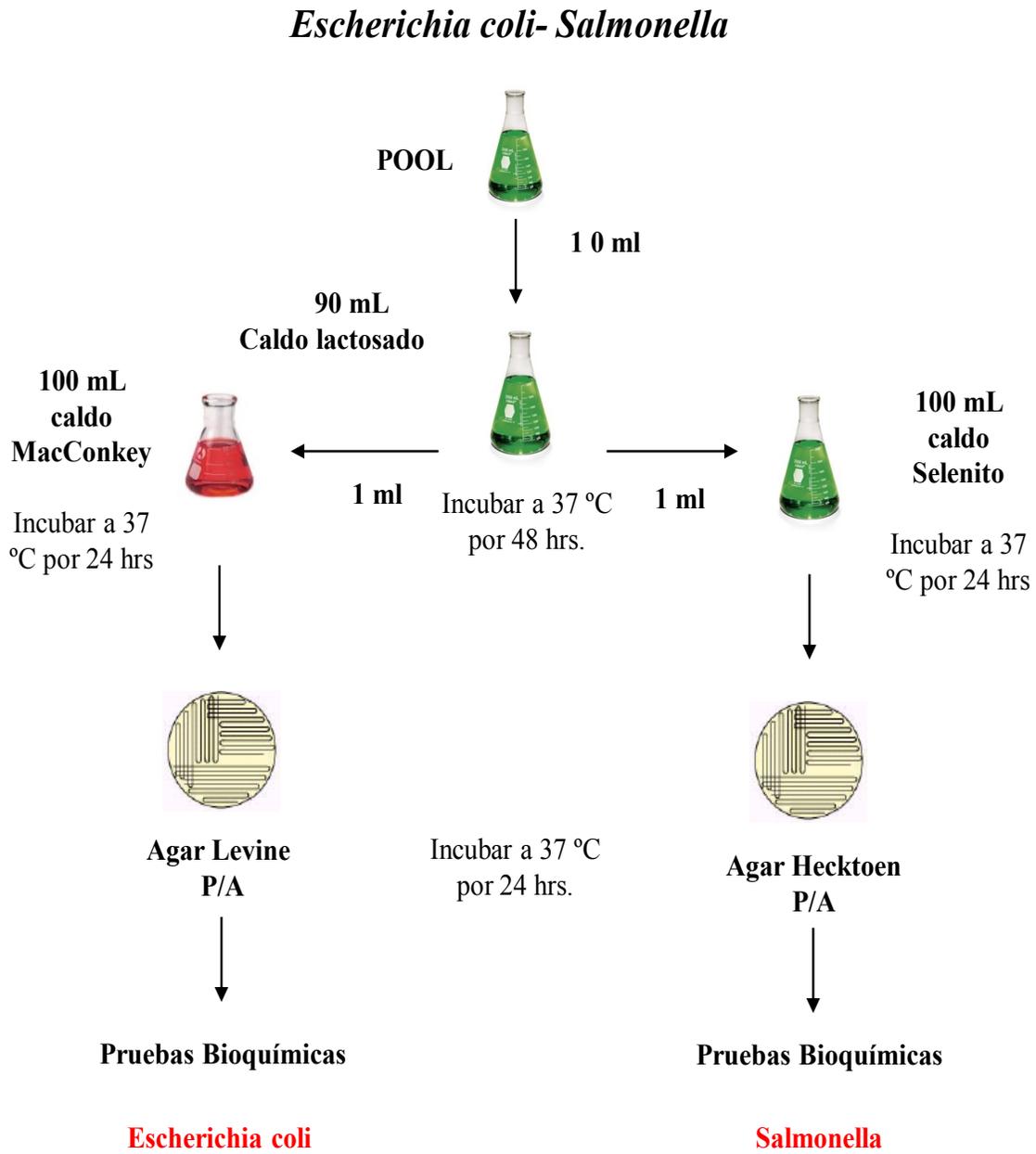
Conteo de Bacteria Aerobias Mesófilas, Hongos y Levaduras



BAM: Incubar a 37 °C por 3 días

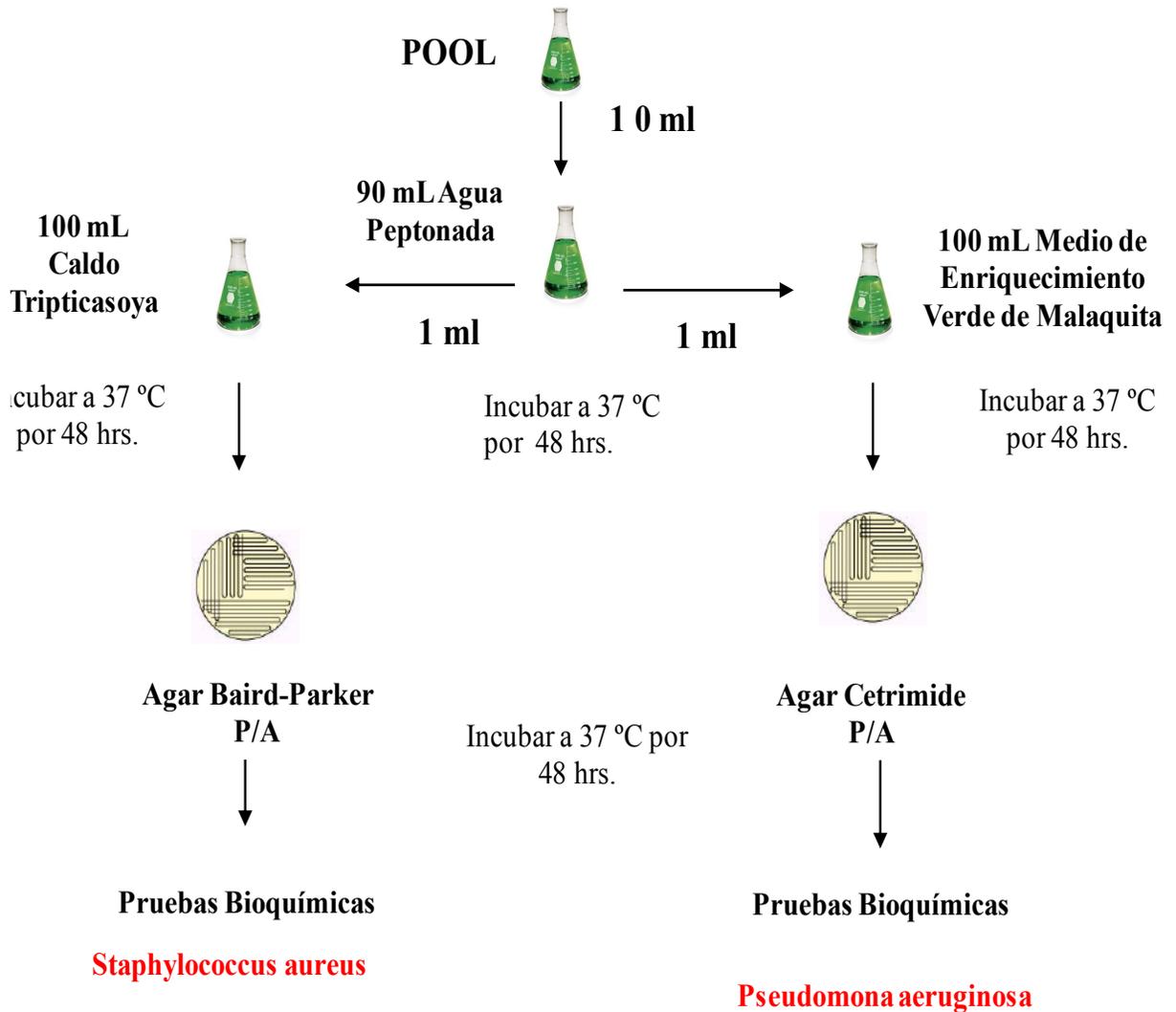
H y L: Incubar a 25 °C durante 5 d

Esquema 2.

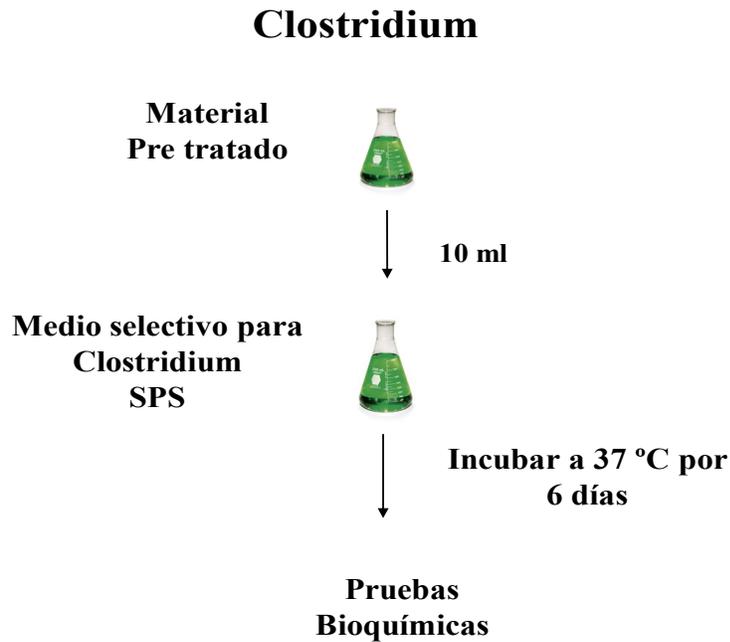


Esquema 3.

Staphylococcus aureus - *Pseudomona aeruginosa*



Esquema 4



Esquema 5

