

# *Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*

**2014 “Por la Pertinencia y la Excelencia Académica”**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Carrera de Farmacia**



## **TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE QUIMICO-FARMACEUTICO**

**“Determinación de Límite Microbiano en Jarabe Liptomiel Comercializado en Centros Naturistas de la Ciudad de León.”**

### **Autores**

- ◆ Br. Adilcia Lisseth Campos Cortez.
- ◆ Br. Anielka del Socorro Castillo Espinoza
- ◆ Br. Denia Junieth Cruz Reyes.

**Tutor: MSc. Fernando Emilio Baca Escoto.**

**Fecha: 28 de Octubre del 2014**

***“A la libertad por la Universidad”***



## **AGRADECIMIENTO**

*A Dios nuestro Señor*, por la sabiduría y entendimiento que nos ha regalado a lo largo de estos años de estudio; a él que gracias a su infinito amor y misericordia hemos logrado culminar nuestra carrera universitaria.

*A nuestros padres*, que han sido nuestros pilares, por su esfuerzo y apoyo incondicional que nos ayudó a cumplir esta meta.

*A nuestros maestros*, por los conocimientos científicos y valores éticos que nos han inculcado para nuestra formación.

*A nuestro tutor*, MSc. Fernando Baca, por el apoyo que nos ha proporcionado para la realización de este trabajo de investigación y los conocimientos transmitidos durante nuestra formación universitaria.



## **DEDICATORIA**

*Primeramente a Dios*, mi Padre celestial, por ser el centro de mi vida y de mi familia, por permitirme alcanzar las metas propuestas, por darme la sabiduría y entendimiento necesario porque gracias a él es que he podido llegar hasta donde estoy.

A *mi madre*, la cabeza y el pilar de mi hogar por todo el apoyo y cariño que me ha brindado a lo largo de esta larga trayectoria, por todo el esfuerzo que ha depositado en mí, teniendo la confianza que iba a aprovechar todas las oportunidades al máximo.

A *mi abuelita*, por ser incondicional en todos los momentos de mi vida, porque a pesar de la distancia ella ha estado pendiente de mí, brindándome siempre el apoyo cuando lo necesité.



## **DEDICATORIA**

*A Dios padre;* quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la confianza ni desfallecer en el intento.

*A María Santísima;* quien a lo largo de mi vida ha sido la intercesora ante Dios padre y en quien he tenido confianza a través de mi Fè evocándola en cada momento.

*A mis padres,* mi primera madre Verónica Espinoza, mi segunda madre y abuela María de los Ángeles Narváez y mi padre José Luis Castillo; quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad.

*A mi esposo,* quien estuvo apoyándome a lo largo de mi carrera dándome su confianza e impulsándome en los momentos más difíciles.

*A mis familiares y amigos,* que siempre me animaron a seguir adelante, dándome una palabra de ánimo y de confianza.



## **DEDICATORIA**

*A Dios*, por darme la oportunidad de existir así; aquí y ahora, por mi vida que he vivido junto a ti. Gracias por derramar sabiduría sobre mí durante todos estos años, por darme las fuerzas que siempre necesite para seguir adelante sin desmayar, a él que gracias a su infinito amor y misericordia he logrado culminar mi carrera universitaria.

*A mi Padre*, por todo el esfuerzo y sacrificio, por ser mi mayor ejemplo de superación y lucha en la vida, por brindarme apoyo incondicional en cada momento.

*A mi Madre* por la inmensidad de su amor, por apoyarme siempre que lo necesite, por sus incansables cuidados y palabras de ánimo, por estar siempre conmigo. Doy gracias a Dios por regalarme a los mejores padres que pudo escoger para mí, quienes sin duda alguna son la base fundamental para lograr mis metas, gracias a ellos he llegado hasta aquí.

*A mis Familiares, abuelitos, tíos, primos* porque de una u otra forma, con su apoyo moral me han incentivado a seguir adelante.

*A mis mejores amigos y amigas*, que me han brindado siempre desinteresadamente su valiosa amistad y que gracias a sus consejos y palabras de aliento he logrado un éxito más.



## INDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	8
<b>OBJETIVOS</b> .....	9
<b>HIPÓTESIS</b> .....	10
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	11
<b>ESPECIES QUE CONTIENE EL FITOFARMACO.</b> .....	12
<b>EUCALIPTO:</b> .....	12
<b>MIEL DE ABEJAS</b> .....	13
<b>PRUEBAS DE LÍMITES MICROBIANOS</b> .....	16
<b>DISEÑO METODOLÓGICO</b> .....	19
<b>RESULTADOS</b> .....	30
<b>ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS</b> .....	43
<b>CONCLUSIONES</b> .....	44
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	45
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	46
<b>ANEXOS</b> .....	50



## INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son un viejo recurso terapéutico y han sido usadas como fuente de preparados medicamentosos, actualmente se sabe que esta práctica se debe a la presencia de principios activos o constituyentes con acción terapéutica que están presentes en ellas. (Parada, M. 2012)

Según el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 11.03.69:13) el control de calidad de productos naturales medicinales para uso humano comprende el muestreo, especificaciones, ensayos, así como la organización, documentación y procedimientos de liberación que aseguren que se llevan a cabo ensayos necesarios y que los materiales no son liberados para el uso, o los productos liberados para la venta o distribución, hasta que su calidad haya sido evaluada como satisfactoria; pero el control de calidad no se limita a las operaciones de laboratorio, sino que debe ser involucrado en todas las decisiones vinculadas con la calidad del producto.

Para que un producto terminado sea aprobado para consumo humano, dicho lote debe estar conforme con las especificaciones establecidas, incluyendo las condiciones de producción, análisis en proceso y la documentación. (RTCA 11.03.69:13)

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. (RTCA 11.03.56:09)

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. (Castro, N. 2002)

En el año 2007 en León- Nicaragua, en la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua en la facultad de ciencias químicas, se realizó un estudio con el nombre de "Determinación de límite microbiano al jarabe de carao (*Cassia grandis l.*) con mayor demanda por la población, comercializado en centros naturistas de la ciudad de León", investigándose la presencia de bacterias aerobias mesófilas, hongos y levaduras , *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Salmonella spp*; encontrándose dentro de los parámetros establecidos, asegurando que eran seguros para la población. (Bolaños J, Bolaños L & López B. 2007)

En el presente trabajo investigativo se pretende realizar el ensayo microbiológico en el jarabe de mayor demanda "Liptomiel" comercializado libremente en los centros naturistas en la ciudad de León. Aunque estos sean seguros también están expuestos a la contaminación bacteriana durante el almacenamiento y fabricación lo cual no garantiza a los consumidores estar exentos de patógenos.

Por lo tanto, a través del estudio podremos proporcionar información a la población de la presencia o ausencia de microorganismos que podrían causarles muchos daños en la salud siendo algunos de ellos irreversibles, alertando por lo tanto a la población si los fitofármacos que se comercializan son seguros y confiables y que además de proporcionarles la mejoría en su salud no van a producirle una enfermedad diferente a la que presentaban primeramente. Así como también le permitirá a la industria productora de este medicamento conocer si deben continuar con el nivel de exigencia actual o adicionar mejoras para obtener un producto de calidad.





## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La industria farmacéutica volvió a interesarse por los ingredientes naturales. Esto sucedió cuando se percataron de que sus procedimientos, aun siendo muy refinados, complejos y costosos no bastan para sintetizar la mayoría de las sustancias medicinales conocidas. Estas sustancias, sin embargo, estaban presentes en las plantas. Empezaron a investigarse esos componentes y a buscarse métodos para extraerlos en cantidades suficientes, garantizando a la vez un alto nivel cualitativo. (Kohler, P. 1999)

Los productos farmacéuticos terminados, deben ser sometidos a un análisis microbiológico que demuestre que cumplen con las especificaciones establecidas por los organismos oficiales, para garantizar que los productos son adecuados para el uso al que están destinados. (Castro, N. 2002)

*¿Actualmente, el Jarabe Liptomiel comercializado en los centros naturistas de la ciudad de León; cumple con las especificaciones establecidas de control de calidad microbiológico según el Reglamento Técnico Centroamericano?*



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

- ✓ Evaluar la calidad microbiológica del jarabe “Liptomiel” comercializado en centros naturistas de la ciudad de León.

### **Objetivos específicos:**

- ✓ Identificar la presencia de bacterias aerobias mesófilas en jarabe “Liptomiel”
- ✓ Determinar la presencia de hongos y levaduras en jarabe “Liptomiel”
- ✓ Identificar la presencia de bacterias patógenas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Salmonella spp* en jarabe “Liptomiel”
- ✓ Realizar la validación al método de límite microbiano en jarabe Liptomiel.



### **HIPÓTESIS**

El jarabe *Liptomiel* comercializado en los centros naturistas de la ciudad de León cumple con las especificaciones de límite microbiano detalladas en el Reglamento Técnico Centroamericano para fitofármacos.



### **MARCO TEÓRICO**

Los jarabes son preparaciones acuosas, lípidas y de elevada viscosidad, que contienen un azúcar, generalmente sacarosa, en concentración similar a la de saturación. (Vila Jato, J. 2008)

El azúcar ejerce una acción conservante, edulcorante y viscosante. La alta concentración de azúcar le confiere al jarabe una elevada presión osmótica que impide el desarrollo fúngico y bacteriano. La mayoría de los jarabes se formulan con una concentración de azúcar cercana, pero inferior a la de saturación, y se añaden agentes conservantes que previenen la proliferación de microorganismos y aseguran su estabilidad durante el período de almacenamiento y utilización. (Vila Jato, J. 2008)

Dentro de los componentes de los jarabes están: azúcares, agua, conservantes, codisolventes, saborizantes, colorantes. (Vila Jato, J. 2008)

La tos es un reflejo defensivo encaminado a eliminar cuerpos extraños de las vías respiratorias, como secreciones, mucosidades, pus, sangre, o simplemente objetos o líquidos procedentes del exterior; esta es la llamada tos productiva. La tos seca no productiva, es de carácter irritativo o espasmódico, acompañada de sensación de picor o escozor en la garganta o vías respiratorias altas. (Schneider, E. 2004).

El fitofármaco es un medicamento extraído de una planta medicinal. El término proviene del griego *phytos* = planta y *pharmakon* = remedio. Aunque el extracto obtenido de una especie vegetal se compone de toda una serie de principios activos, este es considerado como un solo fármaco, ya que su efecto radica en la acción combinada de sus componentes. (Kohler, P. 1999)



ESPECIES QUE CONTIENE EL FITOFARMACO.

EUCALIPTO:

- **Nombre científico:** *Eucalyptus globulus.*
- **Nombre común o vulgar:** Eucalipto
- **Familia:** Mirtáceas.
- **Parte utilizada:** hojas y carbón de su madera

PROPIEDADES MEDICINALES DEL EUCALIPTO	
<b>Expectorante</b>	Es su principal propiedad. Reduce la inflamación de las vías respiratorias. Está indicado para asma y en la bronquitis aguda y crónica.
<b>Antimicrobiano</b>	Es capaz de eliminar microorganismos causantes de enfermedades infecciosas; posee propiedades bactericidas, bacteriostáticas y fúngicas.
<b>Antipirético</b>	Posee propiedades febrífugas, muy útiles para disminuir la fiebre.
<b>Hipoglucemiante</b>	Es muy útil para disminuir los niveles de azúcar en sangre.

(Pamplona, J. 1995)



**-Principios Activos.** (Pamplona, J. 1995)

- ✓ Aceites esenciales: eucaliptol o cineol, limoneno, alcoholes alifáticos, hidrocarburos terpénicos y sesquiterpénicos.
- ✓ Tanino
- ✓ Resina
- ✓ Ácidos grasos
- ✓ Flavonoides.

**MIEL DE ABEJAS**

La miel posee grandes riquezas naturales muy beneficiosas para el ser humano. Y es que algo tan natural, tiene que ser bueno. No sólo es uno de los edulcorantes naturales más ricos que existen, sino que, tiene muchas propiedades curativas por lo que es muy utilizada en la elaboración de remedios caeros y producción de fitofármacos para luego ser comercializados. (Godoy, T & Herrera, M. 2010)

<b>PROPIEDADES MEDICINALES DE LA MIEL</b>	
<b>Para tratar Afecciones de las vías respiratorias superiores</b>	En el tratamiento de rinitis aguda y crónica, faringitis, bronquitis afonías, ronqueras, laringitis, ataques de tos y otras enfermedades respiratorias.
<b>Para tratar la anemia</b>	La miel es notable para la formación de hemoglobina en el cuerpo. Esto es en gran parte debido al hierro, al cobre, y al manganeso contenido en él.
<b>Para tratar estreñimiento y diarrea</b>	Es aplicable a personas estreñidas ya que por su contenido en acetilcolina estimula el peristaltismo del intestino.



<b>Cura Afecciones del tracto gastrointestinal</b>	La miel favorece el proceso de asimilación a nivel del intestino y sobre todo eficaz en casos de estreñimiento. Tiene influencia sobre los movimientos peristálticos.
<b>Gastritis y úlceras de estómago</b>	Efecto cicatrizante e inhibidor de la acidez estomacal en gastritis y úlceras.
<b>Cura Afecciones renales</b>	Su eficacia en este caso se explica por el hecho que contiene pocas proteínas y está casi libre de sales
<b>Alteraciones del sistema nervioso</b>	Por su contenido en sodio, hierro y fósforo sirve para el buen mantenimiento del SN. La miel tiene propiedades somníferas, relajantes e inductoras del sueño.

(Valega, O. 2006)

**Composición** (Valega, O. 2006)

- ✓ -Sodio
- ✓ -Potasio
- ✓ -Magnesio
- ✓ -Calcio
- ✓ -Hierro
- ✓ -Manganeso
- ✓ -Cobre
- ✓ -Fósforo
- ✓ -Zinc
- ✓ -Selenio
- ✓ -Vitaminas A, C y del complejo



Los componentes más usuales de la miel se muestran en la siguiente tabla

Componente	Rango	Contenido típico
Agua	14 - 22 %	18%
Fructosa	28 - 44 %	38%
Glucosa	22 - 40 %	31%
Sacarosa	0,2 - 7 %	1%
Maltosa	2 - 16 %	7,5%
Otros azúcares	0,1 - 8 %	5%
Proteínas y aminoácidos	0,2 - 2 %	
Vitaminas, enzimas, hormonas ácidos orgánicos y otros	0,5 - 1 %	
minerales	0,5 - 1,5 %	
Cenizas	0,2 - 1,0 %	

(Valega, O. 2006)





### **PRUEBAS DE LÍMITES MICROBIANOS**

Son pruebas utilizadas para estimar el número de microorganismos aerobios viables presentes y para determinar la ausencia de especies microbianas designadas en artículos farmacéuticos de todo tipo, desde materias primas hasta productos finales. Durante la preparación y realización de las pruebas, deben tomarse las precauciones asépticas necesarias para la manipulación de las muestras. A menos que se indique algo diferente, cuando el procedimiento especifica simplemente “incubar”, mantener el envase en aire que este termostáticamente controlado a una temperatura entre 30° y 35 °, durante un periodo de 24 a 48 horas. El término “crecimiento” se usa con un sentido especial, es decir, para designar la presencia y supuesta proliferación de microorganismos viables. (USP. 2006)

### **PRUEBAS PREPARATORIAS**

La validez de los resultados de las pruebas depende, en gran medida, de que pueda demostrarse de manera adecuada que las muestras a las que se aplican no inhiben, por sí solas, la multiplicación, bajo las condiciones de la prueba, de los microorganismos que pudieran estar presentes. En consecuencia, antes de realizar una prueba de manera periódica y según las circunstancias lo exijan posteriormente, las muestras diluidas del material que se desea analizar se deben inocular con cultivos viables de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* separados. Esto se puede lograr agregando 1 mL de una dilución de no menos de  $10^{-3}$  de un caldo de cultivo de 24 horas del microorganismo a la primera dilución (en Solución Amortiguadora de Fosfato de pH 7,2, Medio Líquido de Digerido de Caseína y Soja, o Medio Líquido de Lactosa) del material de prueba y siguiendo el procedimiento de prueba. Si el o los microorganismos no crecen en el medio utilizado, queda invalidada esa parte del análisis y debe modificarse el procedimiento: (USP. 2006)

(1) Mediante un aumento en el volumen de diluyente, manteniendo la misma cantidad de material de prueba. (USP. 2006)



(2) Mediante la incorporación de una cantidad suficiente de agentes inactivantes adecuados en los diluyentes. (USP. 2006)

(3) Mediante una combinación apropiada de las modificaciones indicadas en (1) y (2) para permitir el crecimiento de los inóculos. (USP. 2006)

## **SOLUCION AMORTIGUADORA Y MEDIOS**

Los medios de cultivo pueden prepararse como se indica a continuación, o bien pueden utilizarse medios de cultivo deshidratados, siempre y cuando una vez reconstituidos según las indicaciones del fabricante o del distribuidor, contengan ingredientes similares y constituyan medios comparables a los obtenidos con las formulas proporcionadas aquí. Para preparar medios según las fórmulas que se describen aquí, disolver los sólidos solubles en el agua, utilizando calor si fuera necesario, para lograr una disolución completa y agregar soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio en cantidades suficientes para obtener el pH deseado en el medio cuando esté listo para ser utilizado. Determinar el pH a  $25^{\circ} \pm 28^{\circ}$ . Cuando la formula requiera agar, utilizar agar que no contenga más de 15% de humedad. Cuando la formula requiera agua, utilizar Agua Purificada. (USP. 2006)

### ***Solución Amortiguadora de Fosfato de pH 7,2***

Solución Madre: Disolver 34g de fosfato monobásico de potasio en aproximadamente 500 ml de agua en un matraz volumétrico de 1000 ml. Ajustar a un pH de  $7,2 \pm 0,1$  agregando hidróxido de sodio SR (aproximadamente 175 ml), agregar agua a volumen y mezclar. Verter en recipientes y esterilizar. Almacenar bajo refrigeración. Para su uso, diluir la Solución Madre con agua en una proporción de 1 a 800 y esterilizar. (USP. 2006)

## **Medios**

A menos que se indique algo diferente, los medios se deben esterilizar calentándolos en un autoclave y el tiempo de exposición dependerá del volumen que se quiera esterilizar. (USP. 2006)



- I. Medio Líquido de Digerido de Caseína–Lecitina de Soja– Polisorbato 20
- II. Medio Agar Digerido de Caseína y Soja
- III. Medio Líquido de Digerido de Caseína y Soja
- IV. Medio Agar Manitol Salado
- V. Medio Agar Baird–Parker
- VI. Medio Agar Vogel–Johnson
- VII. Medio Agar Cetrinida
- VIII. Medio Agar Pseudomonas para la Detección de Fluorescina
- IX. Medio Agar Pseudomonas para la Detección de Píocianina
- X. Medio Líquido de Lactosa
- XI. Medio Líquido de Selenito–Cistina
- XII. Medio Líquido de Tetratoato
- XIII. Medio Agar Verde Brillante
- XIV. Medio Agar Xilosa Lisina Desoxicolato
- XV. Medio Agar con Sulfito de Bismuto
- XVI. Medio Agar–Hierro–Triple Azúcar
- XVII. Medio Agar MacConkey
- XVIII. Medio Agar Levine con Eosina–Azul de Metileno
- XIX. Medio Agar Sabouraud Dextrosa
- XX. Medio Agar Papa Dextrosa



### **DISEÑO METODOLÓGICO**

- ◆ **Tipo de estudio:** El presente estudio es de tipo cuasi-experimental.
- ◆ **Área de estudio:** Departamento de análisis de drogas y medicamentos, Farmacia Industrial, área de microbiología; ubicado en el segundo piso de la Facultad de Ciencias Químicas, Campus Médico, UNAN-León.
- ◆ **Universo:** Jarabes Liptomiel comercializados en los centros naturistas de la ciudad de León.
- ◆ **Muestra:** 10 frascos de jarabe “Liptomiel” Lote N° 10214009
- ◆ **Unidad de análisis:** Jarabe “Liptomiel”
- ◆ **Procedimiento para la recolección de la información, instrumentos a utilizar:**
  - Entrevista.
  - Recopilación de datos por medio de la elaboración del límite microbiológico en el laboratorio de microbiología.
  - Recopilación bibliográfica
- **Fuentes primarias:**
  1. Entrevista realizada a los dueños de centros naturistas de la ciudad de León.
  2. Ensayo de límite microbiológico realizado a la Muestra.
- **Fuentes secundarias:**
  1. Recopilación bibliográfica (libros, sitios web, monografías)
- ◆ **Criterios de inclusión:**
  - ◆ Jarabe Liptomiel existente en el centro naturista.



- ◆ Comercializados en la ciudad de León.
- ◆ Pertenecientes al mismo número de lote.
- ◆ Frasco Sellado.

◆ **Criterios de exclusión:**

- ◆ No sea jarabe Liptomiel.
- ◆ Jarabe Liptomiel comercializado fuera de la ciudad de León
- ◆ Jarabes con diferente número de lote.
- ◆ Jarabes Liptomiel que no se comercializan en centros naturistas.
- ◆ Frasco que presente alguna alteración.

◆ **Operacionalización de variables**

VARIABLE	DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES	TIPO DE VARIABLE	ESCALA	INDICADOR
<b>Bacterias aerobias mesófilas</b>	Son microorganismos unicelulares, que viven o proliferan en presencia de oxígeno.	Independiente	Menor o igual a $10^4$	Ausencia o Presencia
<b>Hongos y Levaduras</b>	Diversos hongos unicelulares que son importantes por su capacidad para realizar la descomposición.	Independiente	Menor o igual a $10^2$	Ausencia o Presencia
<b>Bacterias patógenas</b>	Son aquellas que causan enfermedades infecciosas.	Independiente	Ausencia o presencia	Ausencia o presencia



- ◆ **Tipo de muestreo:** No probabilístico, por conveniencia, debido a que permite establecer criterios para seleccionar la muestra así como los que nos planteamos y exponemos posteriormente en este estudio.

En el desarrollo de la parte experimental se utilizara el siguiente equipo de laboratorio:

- ◆ Cristalería
  - ✓ Beaker 10mL y 100mL
  - ✓ Pipeta 10mL Serológica y 1mL Volumétrica
  - ✓ Agitador
  - ✓ Tubos de ensayo
  - ✓ Erlenmeyer 250mL
  - ✓ Placas Petri esterilizadas
- ◆ Cocina (Marca: Corning. Modelo: Pc-100)
- ◆ Incubadora (Marca: Presicion. N° serie: 9606-003. Modelo:6M)
- ◆ Contador de colonias (Marca: Quebec Modelo: 3225)
- ◆ Agitador eléctrico (Marca: Bortex. N° de serie: 29681. Model:k550-G)
- ◆ Autoclave (Marca: Pelton y Crans. Modelo: 0CM. N° de serie: A3-77490)
- ◆ Descontaminante (Marca: precisión Modelo 368A)
- ◆ Balanza
- ◆ Horno
- ◆ Mechero



- ◆ pHmetro

**Equipo Metálico:**

- ◆ Gradillas metálicas
- ◆ Material de Laboratorio descartable:
- ◆ Algodón
- ◆ Papel de aluminio
- ◆ Guantes
- ◆ Boquillas
- ◆ Zapatos quirúrgicos
- ◆ Gorros quirúrgicos

**Reactivos:**

- ◆ Tripticaseína-Soja Agar
- ◆ Selenito-Cistina
- ◆ Sabouraud Agar
- ◆ Caldo Tripticaseína Soja
- ◆ Agar EMB
- ◆ Caldo Lactosa
- ◆ Agar Baird Parker
- ◆ Agar Cetrimide
- ◆ Fosfato monobásico



◆ Agar Salmonella-Shiguella

◆ **Procedimiento para el procesamiento de los resultados y programas a utilizar en el análisis de los datos**

**1. Método de recolectar la información**

Los datos se recolectarán de forma experimental, in vitro a través del ensayo de límite microbiano a 10 frascos de Jarabe de un mismo lote, en el Departamento de Análisis de Drogas y Medicamentos, área de microbiología, ubicado en el segundo piso de la Facultad de Ciencias Químicas, Campus Médico, UNAN-León.

**2. Procesamiento de la información.**

Haremos uso del programa estadístico *Excel 2010* para procesar la información, y obtener los resultados necesarios para la realización de nuestras conclusiones.

**MÉTODO**

**Procedimiento:**

**1. Determinación de actividad inhibitoria de la muestra a analizar.**

- 1.1 Preparar suspensiones de cada microorganismo de prueba a una concentración de  $10^3$ / ml a partir de un medio de cultivo de 24 horas que contiene la cepa respectiva.
- 1.2 Agregar 1 ml de la suspensión de *Escherichia coli* en medio lactosado conteniendo ya la muestra y 1 ml de suspensión de *Salmonella spp* en otro frasco con medio lactosado y muestra.
- 1.3 Esto se repite con *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aureginosa* en dos frascos que contengan medio líquido de Caseína soja más muestra.





**2. Toma de la muestra.**

2.1 De los envases individuales se miden cantidades adecuadas y se agregan a un Erlenmeyer vacío y estéril. Esta será la solución madre. Agitar para homogenizar contenido.

2.2 De esta solución madre se transfiere 10 ml a un frasco que contiene solución fosfato pH 7.2

**3. Conteo de bacterias aerobias mesófilas.**

3.1 A partir de la solución de fosfato que contiene muestra (primera dilución,  $10^{-1}$ ) agregar 1 mL a un tubo de ensayo que contiene 9 mL de solución fosfato (segunda dilución,  $10^{-2}$ ). Rotular cuatro placas, dos de ellas con  $10^{-1}$  y las otras como  $10^{-2}$ .

3.2 De la segunda dilución agregar 1 mL a un tubo de ensayo que contiene 9 mL de solución fosfato (tercera dilución  $10^{-3}$ ).

3.3 De cada dilución transferir 1 mL de la solución a dos placas Petri vacías y estériles. Adicionar a cada placa 15 a 20 mL de agar Digerido de Caseína Soja fundido, la temperatura no debe sobrepasar los 45° C, rotar suavemente cada placa para homogenizar el contenido. Dejar solidificar el agar e incubar a 35 a 37° C durante 48h.

**4. Conteo Total de Hongos y Levaduras.**

4.1 De las soluciones fosfatos del procedimiento anterior se transfiere 1 mL de cada dilución respectiva a dos placas Petri vacía y estéril (duplicado). Rotular las placas.

4.2 Se agrega a las placas agar Sabouraud Dextrosa, homogenizar cuidadosamente, esperar que el medio solidifique.

4.3 Las seis placas para cuantificación de hongos se incuban invertidas a temperatura de 20 a 25° C durante 3 a 5 días.



Transcurrido el tiempo de incubación se cuentan las colonias que aparezcan en cada placa, utilizando un contador de colonias. Se toman las placas donde haya más de 30 y menos de 300 colonias. El número de colonias total de las dos placas se dividen entre dos y se multiplican por el factor de dilución. El resultado se expresa en UFC/g o mL de muestra.

## **IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS**

### **5. Identificación de *Staphylococcus aureus*.**

5.1 De la solución madre agregar 10 mL a 90 mL de Caldo Digerido de Caseína Soja.

5.2 Incubar a 35-37° C por 24 h.

5.3 Posterior a la incubación observar si hay turbidez en el medio de cultivo, si no hay turbidez se interpreta como ausencia de *Staphylococcus aureus*.

5.4 Si hay turbidez, con un asa de inoculación estéril se cultiva en agar Baird Parker. Incubar a 35-37° C por 24 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, seleccionar colonias típicas y realizar la Prueba de la Coagulasa.

### **Prueba de Coagulasa**

5.5 Con la ayuda de un asa de inoculación transferir colonias sospechosas representativas desde la superficie de agar del medio Baird Parker a tubos individuales, que contengan cada uno 0.5 mL de plasma de mamífero, preferentemente de conejo o caballo, con o sin aditivo adecuado.

5.6 Incubar en un baño de agua a 37° C, examinando los tubos a las 3 h y posteriormente a intervalos adecuados hasta 24 h.



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

**6. Identificación de *Pseudomona Aeruginosa*.**

6.1 De la solución madre agregar 10 mL a 90 mL de Caldo Digerido de Caseína Soja.

6.2 Incubar a 35-37° C por 24 h.

6.3 Posterior a la incubación observar si hay turbidez en el medio de cultivo, si no hay turbidez se interpreta como ausencia de *Pseudomona aeruginosa*.

6.4 Si hay turbidez, con un asa de inoculación estéril se cultiva en agar Cetrimide. Incubar a 37° C por 24 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, seleccionar colonias típicas y realizar la Prueba de la Coagulasa.

6.5 Posterior a la incubación seleccionar colonias típicas desarrolladas y transferirlas a agar Kligler, incubar entre 35-37 ° C por 24 h.

6.6 A las colonias desarrolladas en agar Kligler realizarles Tinción de Gram, prueba de la oxidasa.

**Prueba de Oxidasa de pigmentos**

6.7 Con la ayuda de un asa de inoculación, realizar estrías de las colonias representativas tomadas de las superficies de agar del medio cetrimide, sobre la superficie de agar del medio *Pseudomonas* agar para la detección de fluorescencia y del medio de pseudomona agar para la detección de Píocianina contenidas en las placas petri.

6.8 Se debe transferir un número grande de colonias sospechosas, dividir la superficie en cada placa en cuadrante e inocular cada uno con una colonia diferente.



Cubrir las placas, invertir el medio inoculado, e incubar a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ}$  C durante no menos de 3 días.

6.9 Examinar las superficies estriadas bajo luz UV. Examinar las placas para determinar si hay colonias presentes.

6.10 Una vez que haya tenido lugar el crecimiento de colonias colocar o transferir las colonias a tiras o discos de papel de filtro que se han impregnado previamente con diclorhidrato de N, n-dimetil -*p*-fenilendiamina. Si no aparece un color rosado que se torna purpura, la muestra cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *Pseudomona aeruginosa*.

## **7. Identificación de Escherichia Coli.**

7.1 De la solución madre transferir 10 mL a 90 de Caldo Lactosado. Incubar a  $45^{\circ}$  C por 24 h.

7.2 Posterior a la incubación si hay turbidez en el medio de cultivo con ayuda de un asa de inoculación estéril, cultivar en agar EMB y agar Mc Conkey. Incubar las placas por 24 h.

7.3 Si aparecen las colonias características, realizarle tinción y ensayos bioquímicos. Transferir las colonias sospechosas individualmente, por medio de un asa de inoculación a la superficie de medio agar de Levine con Eosina- Azul de Metileno colocados en placas Petri. Se debe de transferirse un número grande de colonias, dividir la superficie de cada placa en cuadrante y sembrar cada uno de ellos con una colonia diferente.

Cubrir las placas, invertirlas e incubar.

7.4 Al examinar si ninguna de las colonias exhiben un brillo metálico característico bajo luz reflejada y si ninguna de ellas presenta una apariencia negro azulado

7.5 bajo la luz transmitida la muestra cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *E. Coli*.



**8. Identificación de Salmonella.**

- 8.1 De la solución madre transferir 10 mL a 90 de Caldo Lactosado. Incubar a 45° C por 24 h.
- 8.2 Posterior a la incubación si hay turbidez en el medio de cultivo con ayuda de un asa de inoculación estéril, cultivar en agar Selenito cistina y tetrionato. Incubar las placas a 35-37° C por 24 h.
- 8.3 Con un asa estéril transferir de los medios anteriores a agar verde brillante Xilosa-Lisin-Desoxicolato y del Medio Agar con Sulfito de bismuto contenido en placas Petri. Incubar a 35-37° C por 24 h.
- 8.4 Si se encuentran colonias de bastones Gram negativos proceder con una identificación adicional transfiriendo colonias sospechosas representativas individualmente, por medio de un alambre de inoculación a un tubo inclinado de medio agar Triple azúcar hierro, estriando primero la superficie inclinada y luego clavando el alambre bien por debajo de la superficie. Incubar.
- 8.5 Si en el examen no se hallan indicios de que los tubos presentan líneas oblicuas alcalinas (rojas) y extremos ácidos (amarillo) con o sin ennegrecimiento concomitante de los extremos por producción de sulfuro de hidrógeno, la muestra cumple con los requisitos de la prueba para determinar la Salmonella.



**Especificaciones para determinación de recuento microbiano**

**Expresados en UFC/g o cm<sup>3</sup>**

Producto Natural	Recuento total de aerobios viables	Recuento total de hongos y levaduras
Preparaciones de administracion oral	Menor o igual a 10 <sup>4</sup>	Menor o igual a 10 <sup>2</sup>

<sup>9</sup>(RTCA 11.03.56:09)

**Especificaciones para determinación de recuento microbiano**

**Expresados en UFC/g o cm<sup>3</sup>**

Producto Natural	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aureginosa</i>	<i>Salmonella sp.</i>
Preparaciones de administración oral	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

(RTCA 11.03.56:09)



**RESULTADOS**  
**Informe de Análisis Microbiológico**

**Nombre Comercial:** Liptomiel

**Nombre Genérico:** Eucalipto + Miel de Abejas

**Número de lote:** 10214009

**Fecha de Elaboración:** Nov. 2013

**Fecha de vencimiento:** Mayo 2016

**Número de registro sanitario:** 0191840906

**Forma Farmacéutica:** Jarabe

**Presentación:** Frasco de 120 mL

**Tipo de ensayo:**

**Microbiológico:**.....**X**.....

**Físico Químico**.....

**Fecha de recepción:** 14 de julio del 2014

**Fecha de análisis:** 21 de julio del 2014

<b>Ensayo Realizado: Limite Microbiano Determinación de:</b>	<b>Resultados</b>	<b>Especificaciones</b>	
		<b>RTCA</b>	<b>USP</b>
<i>Bacterias aerobias mesófilas</i>	8 UFC/ml	Menos de 10 <sup>4</sup> UFC/ml	Menos de 100 UFC/ml
<i>Hongos y levaduras</i>	1 UFC/ml	Menos de 10 <sup>2</sup> UFC/ml	Menos de 10 UFC/ml
<u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<u><i>Pseudomona aeruginosa</i></u>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<u><i>Escherichia coli</i></u>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<u><i>Salmonella spp</i></u>	Ausencia	Ausencia	Ausencia



VALIDACIÓN DE LÍMITE MICROBIANO

Repetibilidad y Precisión

<i>S. aureus</i>			
Operador	D1	D2	D3
A1	1048	1007	1029
A2	1063	1006	1026
A3	1052	1009	1030

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	3	3084	1028	421
Fila 2	3	3099	1033	819
Fila 3	3	3091	1030,333333	462,3333333
Columna 1	3	3163	1054,333333	60,33333333
Columna 2	3	3022	1007,333333	2,333333333
Columna 3	3	3089	1029,666667	0,333333333

Promedio de los promedios

567,444444





**ANÁLISIS DE VARIANZA**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analista	37,5555556	2	18,77777778	0,849246231	0,492719813	6,94427191
Dias	3316,22222	2	1658,111111	74,98994975	0,000674826	6,94427191
Repetibilidad	88,4444444	4	22,11111111			
<b>Total</b>	<b>3442,22222</b>	<b>8</b>				

Ahora evaluar la precisión de repetibilidad y de reproducibilidad interna del método

$$s_r = \sqrt{CM_r} = 4,702245$$

**Var Repetibilidad (s<sup>2</sup><sub>r</sub>)**

S<sub>r</sub>  
 RSD%<sub>r</sub> o CV%<sub>r</sub>  
 Promedio Total

0,45633177  
 1030,44444

RSD %<sub>r</sub> =  $\frac{s_r}{\bar{x}} \times 100$

Varianza entre días S <sup>2</sup> <sub>d</sub> =	(MC <sub>d</sub> -MC <sub>r</sub> )/ni	545,3333333
Varianza(operador) s <sup>2</sup> <sub>op</sub> =	(MC <sub>op</sub> -MC <sub>r</sub> )/ni	-1,111111111
Precisión intermedia s <sub>l</sub>	(s <sup>2</sup> <sub>d</sub> +s <sup>2</sup> <sub>op</sub> ) <sup>1/2</sup>	23,32857094
Var Reproducibilidad s <sup>2</sup> <sub>PI</sub> =	s <sup>2</sup> <sub>d</sub> +s <sup>2</sup> <sub>op</sub> +s <sup>2</sup> <sub>r</sub>	567,5507932
Desviación Estándar de Reproducibilidad (s <sub>PI</sub> )=	(s <sup>2</sup> <sub>d</sub> +s <sup>2</sup> <sub>op</sub> +s <sup>2</sup> <sub>r</sub> ) <sup>1/2</sup>	23,797759
RSD <sub>R</sub> % o CV <sub>R</sub> % =	s <sub>R</sub> *100/prom total	2,309465506
Varianza de la media (s <sup>2</sup> <sub>xm</sub> )=	s <sup>2</sup> <sub>d</sub> +s <sup>2</sup> <sub>op</sub> +s <sup>2</sup> <sub>r</sub> /n	566,3333333



<i>P. Aureginosa</i>			
<b>Operador</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>
<b>A1</b>	1106	1072	1041
<b>A2</b>	1098	1077	1047
<b>A3</b>	1112	1070	1045

**Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo**

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	3	3219	1073	1057
Fila 2	3	3222	1074	657
Fila 3	3	3227	1075,666667	1146,333333
Columna 1	3	3316	1105,333333	49,33333333
Columna 2	3	3219	1073	13
Columna 3	3	3133	1044,333333	9,33333333

**Promedios de los promedios = 1074,222222**



**ANÁLISIS DE VARIANZA**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analistas	10,8888889	2	5,444444444	0,16442953	0,8538333	6,94427191
Días	5588,22222	2	2794,111111	84,38590604	0,00053601	6,94427191
Repetibilidad	132,444444	4	33,11111111			
<b>Total</b>	<b>5731,55556</b>	<b>8</b>				

A hora evaluar la precisión de repetibilidad y de reproducibilidad interna del método

$$s_r = \sqrt{CM_r} = 5.754225$$

Var Repetibilidad ( $s_r^2$ )	
$s_r$	
RSD%, o CV%, <sub>r</sub>	0,53566435
Promedio Total	1074,22222

Varianza entre días $S_d^2=$	$(MC_d-MC_r)/ni$	920,3333333
Varianza(operator) $s_{op}^2=$	$(MC_{op}-MC_r)/ni$	-9,222222222
Precisión intermedia $s_t$	$(s_d^2+s_{op}^2)^{1/2}$	30,18461713
Var Reproducibilidad $s_{PI}^2=$	$s_d^2+s_{op}^2+s_r^2$	941,2957282
Desviación Estándar de Reproducibilidad ( $s_{PI}$ )=	$(s_d^2+s_{op}^2+s_r^2)^{1/2}$	30,72819914
RSD <sub>R</sub> % o CV <sub>R</sub> % =	$s_R * 100 / \text{prom total}$	2,860506746
Varianza de la media ( $s_{xm}^2$ )=	$s_d^2+s_{op}^2+s_r^2/n$	944,2222222



<i>Salmonella</i>			
<b>Operador</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>
<b>A1</b>	987	982	989
<b>A2</b>	990	989	995
<b>A3</b>	989	985	993

**Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo**

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	3	2958	986	13
Fila 2	3	2974	991,3333333	10,3333333
Fila 3	3	2967	989	16
Columna 1	3	2966	988,6666667	2,33333333
Columna 2	3	2956	985,3333333	12,3333333
Columna 3	3	2977	992,3333333	9,33333333

**Promedios de los promedios = 988,777778**



**ANÁLISIS DE VARIANZA**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analistas	42,88888889	2	21,44444444	16,7826087	0,01133831	6,94427191
Días	73,55555556	2	36,77777778	28,7826087	0,00422133	6,94427191
Repetibilidad	5,111111111	4	1,277777778			
<b>Total</b>	121,5555556	8				

**Precisión de repetibilidad y de reproducibilidad interna del método**

$$s_r = \sqrt{CM_r} = 1,13038$$

Var Repetibilidad ( $s_r^2$ )	
$S_r$	0,114321777
RSD% <sub>r</sub> o CV% <sub>r</sub>	0,114321777
Promedio Total	988,7777778

Varianza entre días $S^2_{d=}$	$(MC_d - MC_r)/ni$	11,83333333
Varianza (operador) $s^2_{op=}$	$(MC_{op} - MC_r)/ni$	6,722222222
Precisión intermedia $s_I$	$(s^2_d + s^2_{op})^{1/2}$	4,307615994
Var Reproducibilidad $s^2_{PI=}$	$s^2_d + s^2_{op} + s^2_r$	22,86317155
Desviación Estándar de Reproducibilidad ( $s_{PI}$ )=	$(s^2_d + s^2_{op} + s^2_r)^{1/2}$	4,453463072
RSD <sub>R</sub> % o CV <sub>R</sub> % =	$s_r * 100 / \text{prom total}$	0,450400805
Varianza de la media ( $s^2_{xm}$ )=	$s^2_d + s^2_{op} + s^2_r / n$	19,83333333



<i>E.coli</i>			
<b>Operador</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>
<b>A1</b>	973	987	1049
<b>A2</b>	979	992	1055
<b>A3</b>	976	989	1052

**Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo**

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	3	3009	1003	1636
Fila 2	3	3026	1008,667	1652,333333
Fila 3	3	3017	1005,667	1652,333333
Columna 1	3	2928	976	9
Columna 2	3	2968	989,3333	6,333333333
Columna 3	3	3156	1052	9

**Promedios de los  
promedios = 1005,8**



ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analista	48,2222222	2	24,11111	217	8,34011E-05	6,94427191
Días	9880,88889	2	4940,444	1005,77778	2,02304E-09	6,94427191
Repetibilidad	0,44444444	4	0,11111			
Total	9929,55556	8				

Precisión de repetibilidad y de reproducibilidad interna del método

$$s_r = \sqrt{CM_r} = 0,333333$$

Var Repetibilidad ( $s_r^2$ )	
$s_r$	0,03314185
RSD%, o CV%, <sub>r</sub>	1005,77778
Promedio Total	1005,77778

EXA  
CTIT  
UD

Varianza entre días $S_d^2$ =	$(MC_d - MC_r)/ni$	1646,77778
Varianza (operador) $s_{op}^2$ =	$(MC_{op} - MC_r)/ni$	8
Precisión intermedia $s_i$	$(s_d^2 + s_{op}^2)^{1/2}$	40,6789598
Var Reproducibilidad $s_{PI}^2$ =	$s_d^2 + s_{op}^2 + s_r^2$	1695,456738
Desviación Estándar de Reproducibilidad ( $s_{PI}$ )=	$(s_d^2 + s_{op}^2 + s_r^2)^{1/2}$	40,68032558
RSD <sub>R</sub> % o CV <sub>R</sub> % =	$s_r * 100 / \text{prom total}$	4,044663391
Varianza de la media ( $s_{xm}^2$ )=	$s_d^2 + s_{op}^2 + s_r^2/n$	1654,888889



EXACTITUD

	500 UFC			
	Medio + <u><i>Staphylococcus aureus.</i></u>	Medio + <u><i>Escherichia coli.</i></u>	Medio + <u><i>Salmonella spp.</i></u>	Medio + <u><i>Pseudomona aureginosa.</i></u>
A1	504	521	517	494
A2	503	527	514	488
A3	499	531	511	491
Promedio	<b>502</b>	<b>526,3333333</b>	<b>514</b>	<b>491</b>
		<b>526</b>		
	Muestra Esteril + <u><i>Staphylococcus aureus.</i></u>	Muestra Esteril + <u><i>Escherichia coli.</i></u>	Muestra Esteril + <u><i>Salmonella spp.</i></u>	Muestra Esteril + <u><i>Pseudomona aureginosa.</i></u>
A1	400	500	400	400
A2	300	600	500	300
A3	400	400	600	500
Promedio	<b>366,6666667</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>400</b>
% Recup.	<b>73,04116866</b>	<b>94,99683344</b>	<b>97,27626459</b>	<b>81,46639511</b>





	1000 UFC			
	Medio + <u><i>Staphylococcus aureus.</i></u>	Medio + <u><i>Escherichia coli.</i></u>	Medio + <u><i>Salmonella spp.</i></u>	Medio + <u><i>Pseudomona aureginosa.</i></u>
A1	1025	998	994	1067
A2	1031	1012	988	1076
A3	1032	1008	986	1072
<b>Promedio</b>	<b>1029,333333</b>	<b>1006</b>	<b>989,333333</b>	<b>1071,666667</b>
	Muestra Esteril + <u><i>Staphylococcus aureus.</i></u>	Muestra Esteril + <u><i>Escherichia coli.</i></u>	Muestra Esteril + <u><i>Salmonella spp.</i></u>	Muestra Esteril + <u><i>Pseudomona aureginosa.</i></u>
A1	700	900	900	1000
A2	900	1000	700	800
A3	800	900	600	900
<b>Promedio</b>	<b>800</b>	<b>933,333333</b>	<b>733,333333</b>	<b>900</b>
<b>% Recuperado</b>	<b>77,72020725</b>	<b>92,77667329</b>	<b>74,12398922</b>	<b>83,98133748</b>



	1500 UFC			
	Medio + <u>Staphylococcus aureus.</u>	Medio + <u>Escherichia coli.</u>	Medio + <u>Salmonella spp.</u>	Medio + <u>Pseudomona aureginosa.</u>
A1	1504	1519	1489	1509
A2	1515	1509	1497	1496
A3	1509	1522	1496	1500
Promedio	1509,333333	1516,666667	1494	1501,666667
	Muestra Esteril + <u>Staphylococcus aureus.</u>	Muestra Esteril + <u>Escherichia coli.</u>	Muestra Esteril + <u>Salmonella spp.</u>	Muestra Esteril + <u>Pseudomona aureginosa.</u>
A1	1200	1300	1300	1100
A2	1100	1400	1100	1400
A3	1300	1100	1000	1300
Promedio	1200	1266,67	1133,33	1266,67
% Recuperado	79,50530035	83,51648352	75,85899152	84,35072142



N°	Muestra no estèril + Buffer
1	1000
2	1200
3	1100
<b>Promedio</b>	1100

N°	Muestra estèril sin Microorganismo
1	Ausencia
2	Ausencia
3	Ausencia

Microorganismo	A1	A2	A3	S	X Promedios	Exactitud	Precisión VC%
<b>Staphylococcus aureus</b>	79,36	59,64	80,16	11,623172	73,0533333	73,0411687	15,91052965
<b>Escherichia coli</b>	95,96	113,85	75,32	19,281349	95,0433333	94,9968334	20,28690355
<b>Salmonela</b>	77,36	97,27	117,41	20,02511	97,3466667	97,2762646	20,57092529
<b>Pseudomona</b>	80,97	61,47	101,83	20,183819	81,4233333	81,4663951	24,78874025



### **ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

Las muestras de jarabes tomadas del mismo lote de fabricación para realizar ensayo microbiológico de productos no obligatoriamente estériles, contienen 8 UFC/ml de bacterias aerobias mesófilas, valor menor al especificado por el Reglamento Centroamericano para productos naturales el cual es  $10^4$  UFC/ml, cumpliendo de esta forma con dicha especificación.

Al igual, las muestras contienen un valor de 1 UFC/ml de hongos y levaduras, valor que se encuentra dentro de la cantidad aprobada por dicho reglamento, el cual especifica que los productos naturales con preparación de administración oral no deben contener más de  $10^2$  UFC/ml de tales microorganismos.

En cuanto a las bacterias patógenas, en las muestras analizadas hay ausencia de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aureginosa* y *Salmonella spp.* Cumpliendo de esta forma con lo estipulado en el RTCA el cual detalla que la especificación para bacterias patógenas debe ser la ausencia, ya que dichos microorganismos comprometen la salud de los pacientes consumidores de este producto farmacéutico natural.

Por lo tanto, podemos afirmar que el lote del jarabe analizado cumple con las especificaciones de límite microbiano estipuladas en el RTCA, para productos naturales no obligatoriamente estériles de administración oral y por tal razón es seguro para el consumo humano.



## **CONCLUSIONES**

Según los resultados obtenidos después de la realización del Limite Microbiano, el cual es un ensayo para la determinación de microorganismos en productos farmacéuticos no obligatoriamente estériles, el jarabe "Liptomiel" cumple con todas las especificaciones detalladas y planteadas por el Reglamento Técnico Centroamericano, contiene la cantidad de bacterias aerobias mesófilas, hongos y levaduras que son permitidas por dicho documento las cuales no comprometen la salud de la población consumidora. Así como también, no poseen bacterias patógenas que pueden producir una enfermedad adicional de la que presenta el paciente antes de consumir dicho producto.

Este producto natural de uso farmacéutico es seguro para la población. La importancia de realizar este tipo de ensayos microbiológicos en productos farmacéuticos radica principalmente en dar respuesta a las patologías de los pacientes con productos eficaces; así como también podemos asegurar que vamos a controlar dicha enfermedad y no exponer al paciente a una nueva con el producto suministrado.

Los resultados obtenidos mediante la elaboración de esta investigación garantizan su confiabilidad, ya que, el método llevado a cabo fue validado, por lo tanto dichos datos son seguros, exactos y confiables.



## RECOMENDACIONES

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Químicas:

- ✓ Mejorar el área de control microbiológico, para obtener de esta manera resultados más seguros y eficaces.
- ✓ Pedir a los estudiantes que realicen validaciones de los ensayos de límite microbiano al trabajar en tesis, ya que se obtendrán resultados más confiables.

A los estudiantes:

- ✓ Usar siempre correctamente el equipo de protección al entrar al área de microbiología (Boquilla, Guante, Gorro) y de esta manera evitan la contaminación.
- ✓ Hacer buen uso de los equipos del laboratorio.



**BIBLIOGRAFIA**

1. Parada, M. (2012). *Legislación en Chile sobre fitofármacos y plantas medicinales*. Consultado el 27 de Noviembre del 2013. Disponible en: <http://bibliotecavirtualut.suagm.edu/Instruccion/C3%B3mo%20preparar%20una%20bibliograf%C3%ADa.pdf>
2. Reglamento Técnico Centroamericano. RTCA 11.03.69:13. Consultado el 27 de Noviembre del 2013. Disponible en: [http://www.puntofocal.gov.ar/notific\\_otros\\_miembros/nic131\\_t.pdf](http://www.puntofocal.gov.ar/notific_otros_miembros/nic131_t.pdf)
3. Castro, N. (2002). *Control microbiológico de materias primas y productos farmacéuticos no estériles*. Consultado el 27 de Noviembre del 2013. Disponible en: [http://www.academia.edu/5366869/CONTROL\\_MICROBIOLOGICO](http://www.academia.edu/5366869/CONTROL_MICROBIOLOGICO)
4. Vila Jato, J. (2008). *Tecnología farmacéutica*. Madrid: Síntesis, D.L.
5. Montesdeoca, V. (2010). Elaboración y control de calidad de comprimidos farmacéuticos de ajeno (*Artemisia absintium L.*), romero (*Rosmarinus officinalis 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. Consultado el 05 de Febrero del 2014. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/391/1/56T00202.pdf>.
6. Reglamento Técnico Centroamericano. RTCA 11.03.56:09. Consultado el 05 de Febrero del 2014. Disponible en: <http://meic.go.cr/reglatec/consulta/rtc-11-03-56-09.pdf>
7. IICA. (2005). “*Diagnóstico situacional sobre producción, industrialización y comercialización de plantas medicinales y otras especies útiles*”. Consultado el 05 de Febrero del 2014. Disponible en: [http://www.iica.int.ni/IICA\\_NICARAGUA/Publicaciones/Estudios\\_PDF/Plant\\_Medic.pdf](http://www.iica.int.ni/IICA_NICARAGUA/Publicaciones/Estudios_PDF/Plant_Medic.pdf)



8. Cañigüeral, S. Dellacassa E & Bandoni, A. (2003). *Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?*. Consultado el 05 de Febrero del 2014. Disponible en: [http://www.latamjpharm.org/trabajos/22/3/LAJOP\\_22\\_3\\_6\\_1\\_S966JS548J.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/22/3/LAJOP_22_3_6_1_S966JS548J.pdf)
9. Kohler, P.(1999). *El poder curativo del Ginkgo*. Argentina: SIRIO. Consultado el 04 de Febrero del 2014. Disponible en: <http://books.google.com.ni/books?id=qYgSISBL7VUC&pg=PA60&dq=fitofarmacos&hl=es&sa=X&ei=cAXxUqb-C9XSsASQp4DIBQ&ved=0CCkQ6AEwAA#v=onepage&q=fitofarmacos&f=false>.
10. Schneider, E. (2004). *Salud por la Naturaleza*. Madrid: Safeliz. Consultado el 27 de Noviembre del 2013. Disponible en: [http://books.google.com.ni/books?id=IwKDY\\_ZiaJQC&pg=PA102&dq=tos+seca+y+productiva&hl=es&sa=X&ei=uwzUUvKqD4rekQe6uoH4Cw&ved=0CCwQ6AEwAA#v=onepage&q=tos%20seca%20y%20productiva&f=false](http://books.google.com.ni/books?id=IwKDY_ZiaJQC&pg=PA102&dq=tos+seca+y+productiva&hl=es&sa=X&ei=uwzUUvKqD4rekQe6uoH4Cw&ved=0CCwQ6AEwAA#v=onepage&q=tos%20seca%20y%20productiva&f=false)
11. Pamplona, J. (2006). *Salud por las plantas medicinales*. Madrid: Safeliz. Consultado el 29 de Noviembre del 2013. Disponible en: <http://books.google.com.ni/books?id=nqPa43IuMDcC&pg=PA226&dq=uso+medicinal+del+mentha+pulegium&hl=es419&sa=X&ei=ckyyUoGNFsXpkAftuIEQ&ved=0CDYQ6AEwAg#v=onepage&q=uso%20medicinal%20del%20mentha%20pulegium&f=false>
12. Pamplona, J. (1995). *Plantas que curan*. Madrid: Safeliz. Consultado el 27 de Diciembre del 2013. Disponible en: <http://books.google.com.ni/books?id=55KAD9Qj8dwC&pg=PA69&dq=eucalipto&hl=es&sa=X&ei=CmWyUqP1EIy1kQfXhYGABQ&sqi=2&ved=0CFQQ6AEwBw#v=onepage&q=eucalipto&f=false>
13. Godoy, T. Herrera, M. (2011). *Investigaciones Antropológicas*. E.E.U.U.: EDAF. Consultado el 05 de Diciembre del 2013. Disponible en:





[http://books.google.com.ni/books?id=qMtqrQAsa9oC&pg=PA183&dq=principios+activos+de+la+miel+de+abeja&hl=es&sa=X&ei=Q\\_q4UuvpLMKgkAfyuYGgAg&ved=0CF0Q6AEwCA#v=onepage&q=principios%20activos%20de%20la%20miel%20de%20abeja&f=false](http://books.google.com.ni/books?id=qMtqrQAsa9oC&pg=PA183&dq=principios+activos+de+la+miel+de+abeja&hl=es&sa=X&ei=Q_q4UuvpLMKgkAfyuYGgAg&ved=0CF0Q6AEwCA#v=onepage&q=principios%20activos%20de%20la%20miel%20de%20abeja&f=false). Pag 36.

14. Valega, O. (2006). *Propiedades Curativas de la miel y Otros usos*. Consultado el 06 de Diciembre del 2013. Disponible en: [http://www.beekeeping.com/articulos/propiedades\\_curativas.htm](http://www.beekeeping.com/articulos/propiedades_curativas.htm)
15. (2006). *Farmacopea de los Estados Unidos de América*. EUA: Port City Press. Consultado el 10 de Diciembre del 2013.
16. OMS. (2007). WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. España: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Consultado el 05 de Febrero del 2014. Disponible en: <http://www.who.int/medicinedocs/index/assoc/s14878e/s14878e.pdf>
17. (2013). *Diccionario de la Real Academia Española*. Consultado el 10 de Diciembre del 2013. Disponible en: <http://www.rae.es/la-institucion>
18. Flores, W. (2008). *Evaluación de la estabilidad acelerada de una tintura vegetal comercializada con propiedad antibacteriana, preparada a partir de **Gnaphalium stramineum hbk** (flores), **Plantago major L.** (hojas), **Psidium guajava L.** (hojas) y **Tagetes lucida cav.** (hojas y flores), en solución alcohólica al 35%*. Consultado el 19 de Febrero del 2013. Disponible en: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2711.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2711.pdf).
19. Bolaños J, Bolaños L & López B. (2007). *Determinación de límite microbiano al jarabe de carao (cassia grandis L.) con mayor demanda por la población, comercializado en centros naturistas de la ciudad de León*. Consultado el 19 de Febrero del 2013. Leon, Nic: UNAN.

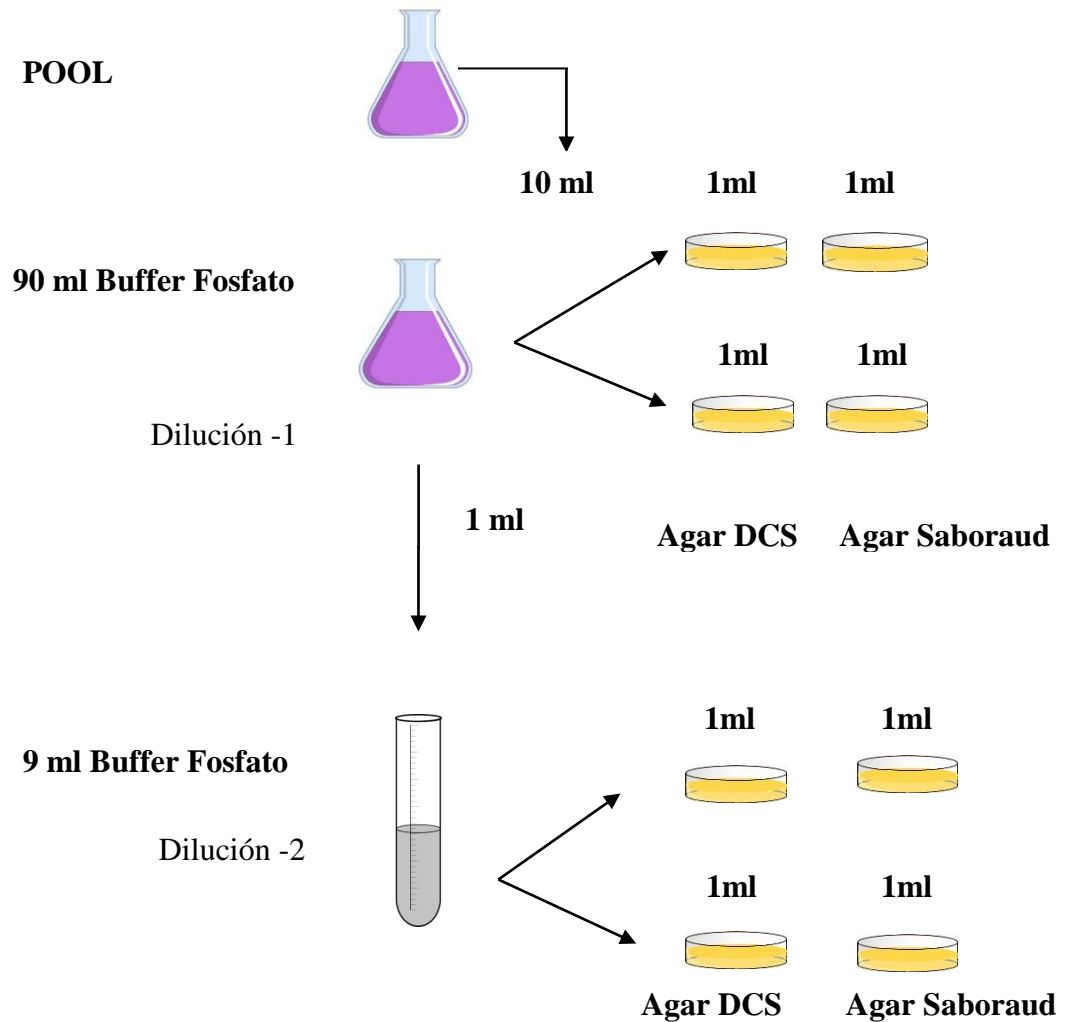


# **ANEXOS**



**ANEXOS**  
**PROCEDIMIENTO**

**Conteo de Bacterias Aerobias Mesófilas, Hongos y Levaduras**

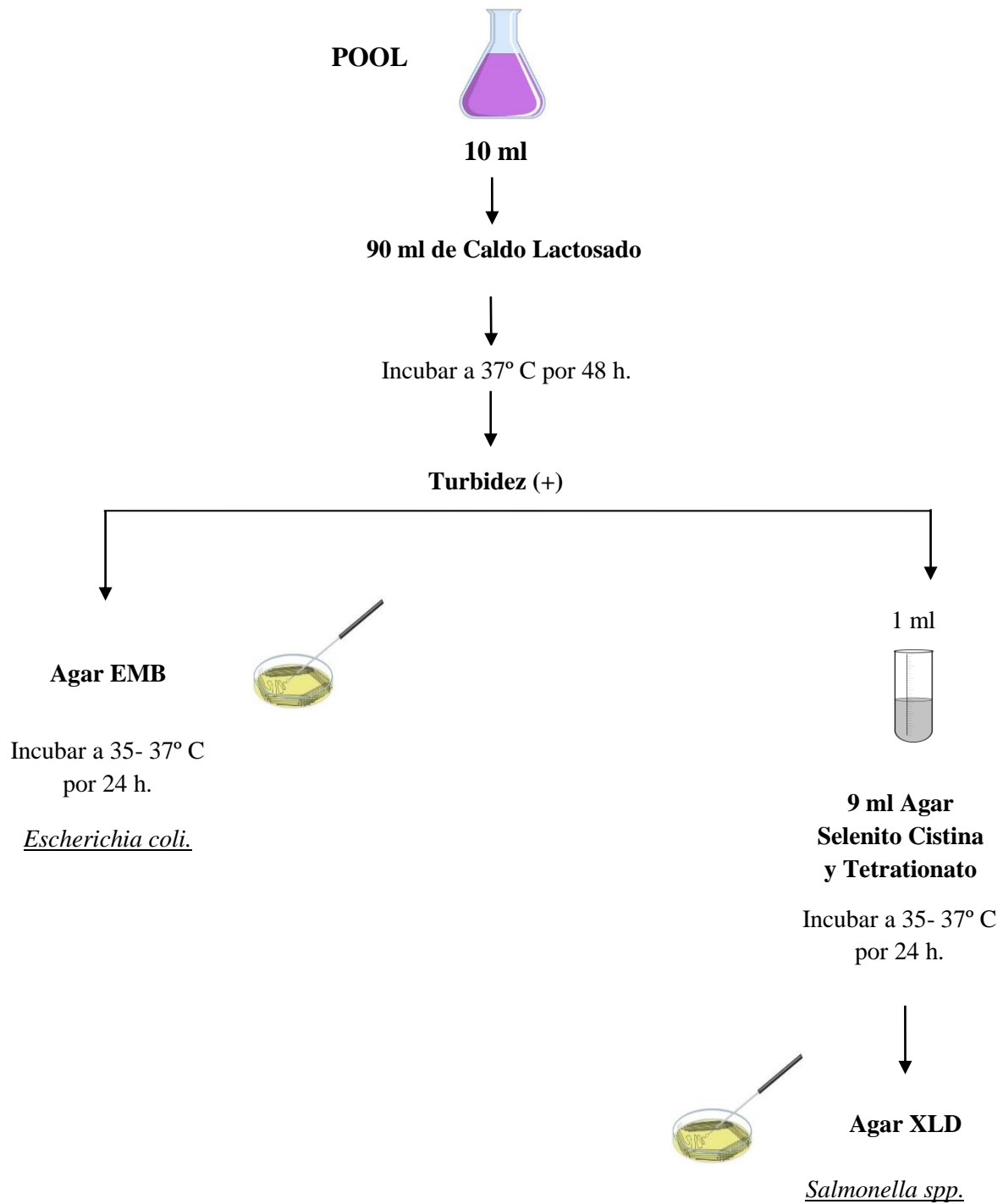


BAM: Incubar a 35-37° C por 48 h.  
días.

H y L: Incubar a 20-25° C durante 3-5

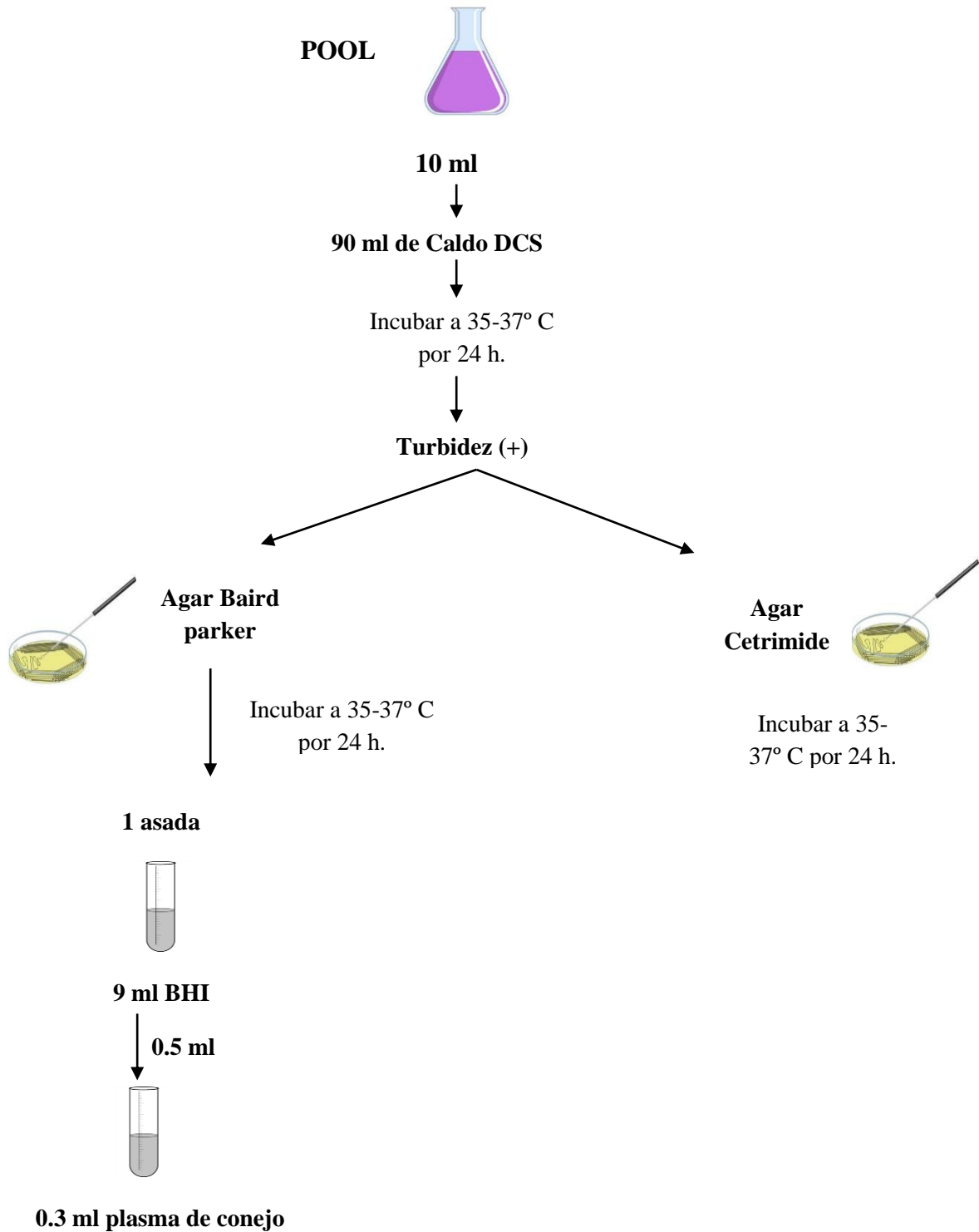


*Escherichia coli- Salmonella*





*Staphylococcus aureus- Pseudomona aeruginosa*





### **ENTREVISTA**

1. **¿Cuál es el jarabe más demandado por la población?**
2. **¿Cuántos de estos jarabes son vendidos durante el mes?**
3. **¿Qué pacientes son los que consumen este medicamento?**
4. **¿Para qué patologías es utilizado este jarabe?**
5. **¿Cuál es el costo de estos jarabes por unidad?**
6. **¿Qué especies medicinales contiene este jarabe?**



**LISTA DE ACRÓNIMOS O SIGLAS**

**C.D:** Digerido de Caseína

**DCS:** Digerido de Caseína Soja

**E. Coli:** *Escherichia coli*.

**IMVIC:** Indol, Rojo de Metilo, Voges- Proskauer y Citrato

**RAE:** Real Academia Española

**RTCA:** Reglamento Técnico Centroamericano

**Sab. :** Saboraud.

**TCS:** Tripticasa Soja.

**V.B:** Verde Brillante.

**XLD:** Xilosa Lisina Desoxicolato.



## **GLOSARIO**

- **Antitusígeno:** Eficaz contra la tos. <sup>29</sup>
- **Antiséptico:** Que sirve para la antisepsia. <sup>29</sup>
- **Astringente:** Dicho de una sustancia: Apretar, estrechar, contraer los tejidos orgánicos. <sup>29</sup>
- **Bacteria:** Microorganismo unicelular procarionte, cuyas diversas especies causan las fermentaciones, enfermedades o putrefacción en los seres vivos o en las materias orgánicas. <sup>29</sup>
- **Emoliente:** Dicho de un medicamento: Que sirve para ablandar una dureza o un tumor. <sup>29</sup>
- **Estéril:** Libre de gérmenes patógenos. <sup>29</sup>
- **Espasmódico:** Perteneciente o relativo al espasmo. <sup>29</sup>
- **Expectorante:** Que hace expectorar. <sup>29</sup>
- **Inocular:** introducir en un organismo una sustancia que contiene los gérmenes de una enfermedad. <sup>29</sup>
- **Levadura:** Nombre genérico de ciertos hongos unicelulares, de forma ovoidea, que se reproducen por gemación o división. Suelen estar unidos entre sí en forma de cadena, y producen enzimas capaces de descomponer diversos cuerpos orgánicos, principalmente los azúcares, en otros más sencillos. <sup>29</sup>
- **Límpida:** Limpio, terso, puro, sin mancha. <sup>29</sup>





- **Moho:** Nombre de varias especies de hongos de tamaño muy pequeño que viven en los medios orgánicos ricos en materias nutritivas, provistos de un micelio filamentosos y ramificado del cual sale un vástago que termina en un esporangio esférico, a manera de cabezuela.<sup>29</sup>
- **Mucolítica:** medicamento o de una sustancia: Que hace más fluidas las secreciones mucosas.<sup>29</sup>
- **Proliferación:** Multiplicarse abundantemente.<sup>29</sup>
- **Tónico:** reconstituyente.<sup>29</sup>
- **Translúcidas:** Dicho de un cuerpo: Que deja pasar la luz, pero que no deja ver nítidamente los objetos.<sup>29</sup>
- **Vermífugo:** Que tiene virtud para matar las lombrices intestinales.<sup>29</sup>



**EQUIPO**

**Cocina**



**Incubadora**



**Balanza**



**Autoclave**





**Mechero**



**pH Metro**



**Agitador Eléctrico**



**Gradillas Metálicas**





**Contador de colonias**



**Baño María**





**Material de Laboratorio descartable**

**Algodón**



**Papel de aluminio**



**Guantes**



**Boquillas**



**Zapatos quirúrgicos**



**Gorros quirúrgicos**





### PRECISION Y REPETIBILIDAD

DIA 1				
	S. Aureus	P. Aureginosa	Salmonella	E.Coli
A1	1048	1106	987	973
A2	1063	1098	990	979
A3	1052	1112	989	976
Media	1054,33333	1105,333333	988,666667	976

DIA 2				
	S. Aureus	P. Aureginosa	Salmonella	E.Coli
A1	1007	1072	982	987
A2	1006	1077	989	992
A3	1009	1070	985	989
Media	1007,33333	1073	985,333333	989,333333

DIA 3				
	S. Aureus	P. Aureginosa	Salmonella	E.Coli
A1	1029	1041	989	1049
A2	1026	1047	995	1055
A3	1030	1045	993	1052
Media	1028,33333	1044,333333	992,333333	1052



EXACTITUD

	500 UFC			
	Medio + <u><i>Staphylococcus aureus.</i></u>	Medio + <u><i>Escherichia coli.</i></u>	Medio + <u><i>Salmonella spp.</i></u>	Medio + <u><i>Pseudomona aureginosa.</i></u>
A1	504	521	517	494
A2	503	527	514	488
A3	499	531	511	491
Promedio	<b>502</b>	<b>526,3333333</b>	<b>514</b>	<b>491</b>
		<b>526</b>		
	Muestra Esteril + <u><i>Staphylococcus aureus.</i></u>	Muestra Esteril + <u><i>Escherichia coli.</i></u>	Muestra Esteril + <u><i>Salmonella spp.</i></u>	Muestra Esteril + <u><i>Pseudomona aureginosa.</i></u>
A1	400	500	400	400
A2	300	600	500	300
A3	400	400	600	500
Promedio	<b>366,6666667</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>400</b>
% Recup.	<b>73,04116866</b>	<b>94,99683344</b>	<b>97,27626459</b>	<b>81,46639511</b>



	1000 UFC			
	Medio + <u>Staphylococcus aureus.</u>	Medio + <u>Escherichia coli.</u>	Medio + <u>Salmonella spp.</u>	Medio + <u>Pseudomona aureginosa.</u>
A1	1025	998	994	1067
A2	1031	1012	988	1076
A3	1032	1008	986	1072
<b>Promedio</b>	<b>1029,333333</b>	<b>1006</b>	<b>989,3333333</b>	<b>1071,666667</b>
	Muestra Esteril + <u>Staphylococcus aureus.</u>	Muestra Esteril + <u>Escherichia coli.</u>	Muestra Esteril + <u>Salmonella spp.</u>	Muestra Esteril + <u>Pseudomona aureginosa.</u>
A1	700	900	900	1000
A2	900	1000	700	800
A3	800	900	600	900
<b>Promedio</b>	<b>800</b>	<b>933,3333333</b>	<b>733,3333333</b>	<b>900</b>
<b>% Recuperado</b>	<b>77,72020725</b>	<b>92,77667329</b>	<b>74,12398922</b>	<b>83,98133748</b>





	1500 UFC			
	Medio + <u><i>Staphylococcus aureus.</i></u>	Medio + <u><i>Escherichia coli.</i></u>	Medio + <u><i>Salmonella spp.</i></u>	Medio + <u><i>Pseudomona aureginosa.</i></u>
A1	1504	1519	1489	1509
A2	1515	1509	1497	1496
A3	1509	1522	1496	1500
<b>Promedio</b>	<b>1509,333333</b>	<b>1516,666667</b>	<b>1494</b>	<b>1501,666667</b>
	Muestra Esteril + <u><i>Staphylococcus aureus.</i></u>	Muestra Esteril + <u><i>Escherichia coli.</i></u>	Muestra Esteril + <u><i>Salmonella spp.</i></u>	Muestra Esteril + <u><i>Pseudomona aureginosa.</i></u>
A1	1200	1300	1300	1100
A2	1100	1400	1100	1400
A3	1300	1100	1000	1300
<b>Promedio</b>	<b>1200</b>	<b>1266,67</b>	<b>1133,33</b>	<b>1266,67</b>
<b>% Recuperado</b>	<b>79,50530035</b>	<b>83,51648352</b>	<b>75,85899152</b>	<b>84,35072142</b>



N°	Muestra no estèril + Buffer
1	1000
2	1200
3	1100
<b>Promedio</b>	1100

N°	Muestra estèril sin Microorganismo
1	Ausencia
2	Ausencia
3	Ausencia

Microorganismo	A1	A2	A3	S	X Promedios	Exactitud	Precisión VC%
<b>Staphylococcus aureus</b>	79,36	59,64	80,16	11,623172	73,0533333	73,0411687	15,91052965
<b>Escherichia coli</b>	95,96	113,85	75,32	19,281349	95,0433333	94,9968334	20,28690355
<b>Salmonela spp</b>	77,36	97,27	117,41	20,02511	97,3466667	97,2762646	20,57092529
<b>Pseudomona aureginosa</b>	80,97	61,47	101,83	20,183819	81,4233333	81,4663951	24,78874025



**Imágenes de resultados Limite Microbiano**



**Ausencia de *Escherichia coli***

**Medio específico Agar EMB**



**Ausenci**

**a de *Staphylococcus aureus***



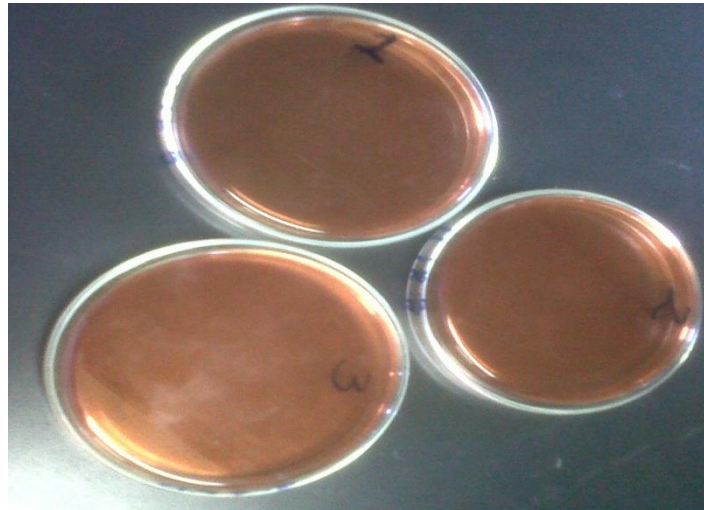
**Medio específico Agar Baird Parker**



**Ausencia**

*Pseudomona aeruginosa*

**Medio específico Agar Cetrimide**

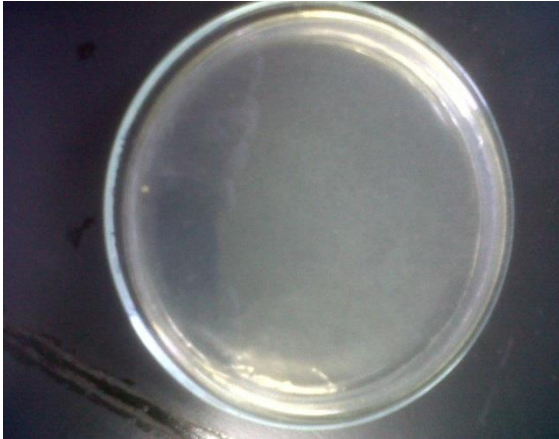


**Ausencia de *Salmonella***



Medio específico Agar XLD

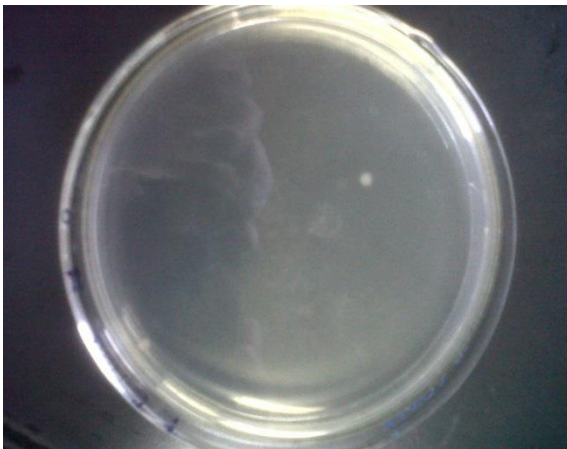
Bacterias Aerobias Mesófilas



2 UFC



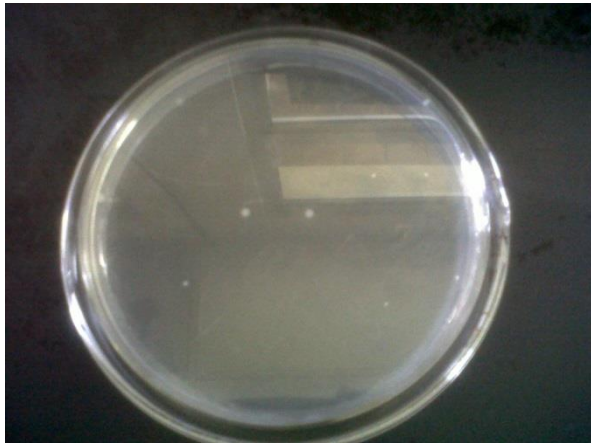
7 UFC



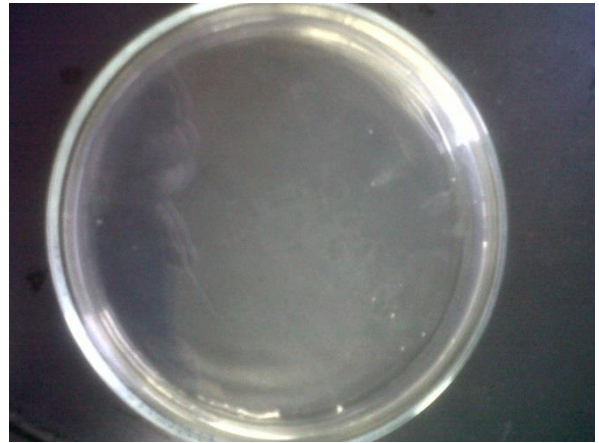
2 UFC



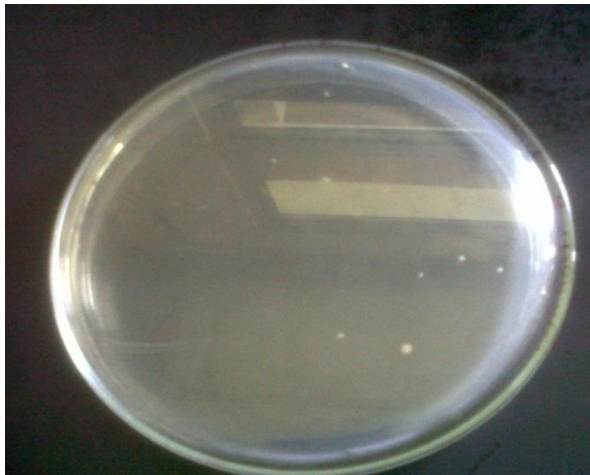
0 UFC



10 UFC



13 UFC



10 UFC



14 UFC