

**Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
Facultad de Ciencias Químicas
UNAN-León**



“Evaluación de la calidad microbiológica de cuatro formas fitoterapéuticas que se expenden en los diferentes centros botánicos de la ciudad de León”.

Autores:

- ❖ Carla Orlandesa Mora Sánchez.
- ❖ Adriana Isabel Sirias Granados.
- ❖ Luis Octavio Suazo.

Tutor:

- ❖ MSc. Fernando Baca Escoto.

Noviembre, 2014

"A la libertad por la Universidad"



Dedicatoria

*A Dios nuestro Padre Creador
Principio y fin de todas las
cosas por su infinita
misericordia.*

*A nuestros Padres por habernos
guiado con amor, dedicación,
sacrificio, comprensión y apoyo
a quienes les debemos lo que
somos.*

*A nuestros Hermanos por
compartir los momentos más
valiosos de nuestras vidas, por
su apoyo y nobleza brindada en
todo momento.*



Agradecimiento

Nuestro agradecimiento y reconocimiento al MSc. Fernando Emilo Baca Escoto, tutor del presente trabajo, por su constante apoyo y orientación brindada durante toda la investigación.

A los señores Gladys Rojas y David Espinoza por su constante ayuda y sugerencias en el desarrollo del trabajo.

A la MSc. María Elena Vargas por su apoyo desinteresado.

A todas las personas que contribuyeron a la culminación de este trabajo.



Índice

1.Introducción.....	1
2.Planteamiento del problema	3
3.Objetivos.....	4
4.Marco Teórico	5
4.1 Fitofármacos.....	5
4.2 Preparaciones Fitoterapeuticas.	5
4.3 Control de calidad.	6
4.4 Determinación o garantía de la calidad de los agentes fitoterapéuticos. .	10
4.5 Identidad.....	10
4.6 Comprobación de la identidad correcta	11
4.7 Pureza.....	11
4.8 Acerca de las buenas prácticas de manufactura de fitofármacos	11
4.9 Las Especificaciones de calidad de la materia prima vegetal deben contemplar:	12
4.10 Con relación a las especificaciones del Producto Final, se exige que:	12
4.11 Materia prima utilizada en los fitofármacos a evaluar.	13
4.11.1 Hierba de San Juan.....	13
4.11.2 Caléndula.....	14
4.11.3 Valeriana	15
4.11.4 Carao	16
4.12 Microorganismos implicados en este estudio.	17
4.12.1 Género Escherichia	17
4.12.2 Género Pseudomonas.....	18
4.12.3 Género Staphylococcus.....	19
4.12.4 Género Salmonella.....	20



4.12.6 Hongos y levaduras.....	21
4.12.7 Bacterias aerobias mesófilas.	22
4.13 Prueba de límite microbiano.....	23
5. Hipótesis.....	24
6. Material y método.....	25
6.1 Operacionalización de variables.....	27
6.2 Material y equipo	29
7. Procedimiento	31
8. Niveles microbianos.	32
9. Pruebas preliminares	33
10. Preparación de las muestras	34
11. Conteo microbiano total aeróbico.	35
11.1 Método en placa	36
11.2 Ensayo para <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
11.3 Prueba de coagulasa (<i>Staphylococcus aureus</i>).....	37
11.4 Prueba de oxidasa y pigmentos (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>).	37
11.5 Prueba para determinar la ausencia de <i>Salmonella</i> pp y <i>Escherichia coli</i>	38
11.6 Prueba para determinar la ausencia de <i>Salmonella</i> pp.....	38
11.7 Prueba para <i>Escherichia coli</i>	39
11.8 Conteo total combinado de hongos y levaduras.....	40
11.9 Repetición del análisis.	40
12. Resultados.....	41
13. Validación para Ensayo de Limite Microbiano	45
13.1 Repetibilidad	45



13.2 Exactitud.....	55
14.Análisis de Resultados	63
15.Conclusión	65
16.Recomendaciones.....	66
17.Bibliografía.....	67
18.ANEXOS.....	74
18.1 Ensayo de Limite Microbiano.....	74
18.2 Imágenes de Resultado de Límite Microbiano	75
18.3 Muestras	79
18.4 Entrevista.....	80
19 Tablas.....	81
20 Glosario.....	82



1. Introducción

Aun existiendo en América Latina numerosas investigaciones en química y farmacología de productos naturales, cuyos resultados son comparables a los obtenidos en las investigaciones llevadas a cabo en laboratorios de primer mundo, los productos fitoterapéuticos que existen en el mercado se caracterizan por su baja calidad y por la inexistencia de informaciones que certifiquen si no su eficacia terapéutica, al menos la ausencia de toxicidad. Estos productos se distribuyen libremente en el transporte urbano-colectivo, mercados, ambulatoriamente y en Centros botánicas.(Sharapin Nikolai. 2000)

Es importante que los fitofármacos estén libres o tengan un bajo contenido de microorganismos, ya que la presencia de éstos en altas concentraciones debe ser juzgada como potencialmente peligrosa para la salud. Por ello, la calidad microbiológica está determinada en gran medida desde el cultivo y cosecha de la planta, hasta su procesamiento en la industria farmacéutica, donde se debe tener especial cuidado. (Arguello G. Nadia. Martínez U. Yessenia. 2004)

Se han realizado estudios sobre la Determinación de Limite Microbiano en diferentes fitofármacos tales como:

- Arguello G. Nadia. Martínez U. Yessenia. 2004 “Análisis microbiológico de fitofármacos no obligatoriamente estériles elaborados por el laboratorio Ecolife” UNAN-León, Facultad de Ciencias Químicas, León-Nicaragua.
- Andino Medina Allam Noé, Espinoza Lira Walter Manuel, Lagos Vásquez Ariel Antonio.2007 “Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en farmacias y/o centros naturistas de la ciudad de león”.
- Arbizu Ramírez Yessenia, Berrios Romero María José. 2008 “Estudio microbiológico en jarabe de carao (*Cassia grandis* L.) con mayor demanda a nivel ambulatorio en la ciudad de león



Este estudio será de gran importancia ya que a través del mismo se pudo comprobar que no todos los productos evaluados que están a la disposición de la población cumplen con las normas de calidad microbiológicas establecidas por **la Farmacopea 36 NF 31 y el Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 11.03.56:09 “Productos Farmacéuticos. Productos Naturales Medicinales para uso Humano”** para su distribución y consumo. Lo que nos dará una idea general de cómo es el comportamiento de los fitofármacos usados para la salud humana, así como su preparación.

En esta investigación se evaluará la calidad microbiológica del jarabe de carao, gotas de valeriana, capsulas de hierba de san Juan y crema de caléndula, ya que son algunas de las formas fitoterapéuticas con más demanda por la población de la ciudad de León.

Este trabajo de investigación tendrá un impacto social ya que podrá ser utilizada con fines didácticos en la carrera de Farmacia de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-León) en el área de control de calidad y microbiología, además servirá de base para futuras investigaciones relacionadas con el tema.



2. Planteamiento del problema

¿Cuál es la calidad microbiológica que tienen cuatro formas fitoterapéuticas que se expenden en los diferentes centros botánicos de la ciudad de León?



3. Objetivos

Objetivo general:

Evaluar la calidad microbiológica de cuatro formas fitoterapéuticas que se expenden en los diferentes centros botánicos de la ciudad de León.

Objetivos específicos:

- Determinar la presencia de bacterias aerobias mesófilas.
- Determinar la presencia de bacterias patógenas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*
- Determinar la presencia de hongos y levaduras.



4. Marco Teórico

4.1 Fitofármacos.

Se define como medicamento fitoterapéutico: “Todo producto técnicamente obtenido y elaborado, usando exclusivamente materias primas activas vegetales, con finalidad profiláctica, curativa o para fines de diagnóstico con beneficio para el usuario. Esta clase de medicamentos se caracteriza, por el conocimiento que se tiene sobre su eficacia y sobre los riesgos de su utilización, así como, por la reproducibilidad y su calidad constante; se presentan como un producto final acabado, empacado y etiquetado” (Sharapin Nikolai. 2000).

La legislación brasileña define a la materia prima vegetal, como la planta fresca, droga vegetal o preparado fitoterapéutico empleado en la fabricación del producto fitoterapéutico. (Sharapin Nikolai. 2000)

Para la preparación de los medicamentos fitoterapéuticos se pueden utilizar coadyuvantes farmacéuticos que estén permitidos por la legislación vigente. El fitomedicamento no puede contener sustancias activas de otros orígenes. (Sharapin Nikolai. 2000)

4.2 Preparaciones Fitoterapéuticas.

El preparado fitoterapéutico intermediario es el producto triturado, pulverizado, extracto, tintura, aceite fijo o volátil, cera y jugos obtenidos de las plantas frescas o de las drogas vegetales, a través de operaciones de extracción, fraccionamiento, concentración y purificación, utilizado en la fabricación del producto fitoterapéutico. (Sharapin Nikolai. 2000).

La industria utiliza como materia prima de preferencia, el material vegetal seco, una vez que este material ha sido sometido a procesos de secado y estabilización. El secado del material es de gran importancia porque interrumpe los procesos enzimáticos de las células vegetales impidiendo así el crecimiento de microorganismos, por lo tanto se facilita el almacenamiento y transporte de este material sin riesgos de deterioro. (Sharapin Nikolai. 2000).



Los extractos vegetales, se clasifican según su consistencia en: Fluidos, Blandos y Secos. Los fluidos son líquidos y corresponden en general, a la droga seca en proporción 1:1 (1ml de extracto corresponde a 1 gr. de la droga seca). Los extractos blandos son semi-sólidos, con contenido de agua aproximadamente de 60%, en cambio los extractos secos son sólidos, polvos o granulados. (Sharapin Nikolai. 2000).

La fabricación de un producto fitoterapéutico, o el aislamiento de un constituyente químico a partir de la materia prima vegetal comprenden las operaciones de molienda, extracción, concentración, purificación y secado. (Sharapin Nikolai 2000)

Como el material a ser producido exige calidad constante, algunos criterios son aplicables a todos los productos, sin diferencia. Todas las preparaciones que se destinan al uso terapéutico deben satisfacer la exigencia de estabilidad, pureza, esterilidad, límite de solventes residuales o pesticidas, conforme a lo establecido a las normas oficiales en vigor. (Sharapin Nikolai. 2000)

La preocupación por la calidad de los medicamentos y por el establecimiento de normas o patrones para la fabricación no es reciente: aparece en los escritos del emperador chino Sheang Nong aproximadamente en el año 2500 A.C y en el código de Hamurabi (año 2000 A.C). (Sharapin Nikolai. 2000)

4.3 Control de calidad.

Sabiendo la creciente e importante participación de las plantas medicinales y los medicamentos de origen vegetal en el arsenal terapéutico, se hace necesario efectuar controles de calidad a través de técnicas modernas y eficientes. Las plantas medicinales que constituyen la materia prima para la elaboración de productos fitofarmacéuticos poseen variaciones en el contenido de sus principios activos y pueden sufrir deterioro y contaminación, motivo por el cual es importante realizar un control de calidad a las materias primas vegetales. (Sharapin Nikolai. 2000)

Entre los problemas detectados en el control de calidad se relaciona:



❖ **La droga utilizada no está descrita en la farmacopea y puede presentarse una sustitución o una falsificación.**

Las adulteraciones de la materia prima vegetal se dan en mayor y menor grado. Las sustituciones son frecuentemente justificadas debido a la dificultad de obtener la especie farmacopeica. Por ejemplo “*la especie Mikania Glomerata (Guaco)*” la cual posee acción antitusígena ha sido sustituida por otras especies del genero *Mikania*. A diferencia de las falsificaciones las cuales son adulteraciones y que en general ocurren en la recolección de las plantas nativas, en donde los recolectores por ignorancia o mala fe, mezclan la especie medicinal con otras de características semejantes. También existen sustituciones las cuales la llevan a cabo mayoristas y fabricantes sin escrúpulos las cuales consisten en la utilización de plantas de un valor económico menor y de acción farmacológica no comprobada, ejemplo de ello es la sustitución frecuente con *Ginseng* por especies del genero *Pfaffia*. (Sharapin Nikolai. 2000).

Las adulteraciones son de difícil detección y se presentan principalmente en extractos y tinturas; incluso drogas extraídas exhaustivamente pueden también ser objeto de una sofisticación. Estas prácticas consisten en adicionar a la droga extraída o a los extractos y tinturas de bajo contenido de principios activos, sustancias naturales aisladas o sustancias sintéticas de estructura semejante a los principales activos que están contenidos originalmente en la planta. (Sharapin Nikolai. 2000).

Se han encontrado extractos de guaraná adicionados de cafeína sintética, droga que contienen principios activos antraquinónicos adicionados de antrona sintética y extractos de belladona adicionados de alcaloides secundarios de las especies del genero *Duboisia*. (Sharapin Nikolai. 2000).

❖ **Parte de la planta no corresponde a la prescrita.**

Los principios activos no se distribuyen uniformemente por toda la planta sino que se localizan preferencialmente en algunas partes y órganos; la utilización de partes de la planta que no corresponde a la descripción farmacopeica, da como resultado una materia prima pobre en sustancias activas e incluso desprovistas de ellas. (Sharapin Nikolai. 2000).



❖ **La cantidad de sustancias extrañas es superior a la permitida.**

La definición farmacopéica de sustancias extrañas comprende: plantas diferentes de la descrita, partes de la misma planta diferentes de la planta descrita y otras materias extrañas. Algunas veces la farmacopéica establece un límite para partes de la planta diferentes de la prescrita por ejemplo La manzanilla (*Matricaria Recutita*) en donde el porcentaje de tallos no puede ser superior al 5% del total de la droga (inflorescencias). Los tallos están prácticamente desprovistos de aceites esenciales, uno de los parámetros cuya determinación es exigida por la farmacopea. (Sharapin Nikolai. 2000).

❖ **El contenido de cenizas es superior al permitido.**

La ceniza resultante de la incineración del material vegetal puede ser fisiológica y no fisiológica. La ceniza fisiológica es aquella derivada de los componentes minerales de la propia planta. La que se deriva de material extraño, principalmente suelo y arena que se adhieren a la superficie de la droga, se denomina ceniza no fisiológica. Un contenido de ceniza superior al permitido indica generalmente un procedimiento de recolección y almacenamiento inadecuado. (Sharapin Nikolai. 2000).

❖ **El contenido de componentes activos no corresponde al prescrito.**

El contenido de componentes activos por debajo del prescrito indica baja calidad de la materia prima vegetal. Cuando se trata de las utilidades de la droga vegetal para el aislamiento de sustancias naturales puras, el problema se reduce a un menor rendimiento y eventualmente, a dificultades adicionales durante el proceso de aislamiento, en función de la naturaleza y el contenido más elevado de componentes secundarios. Cuando la materia prima vegetal se destina a la fabricación de extractos, tinturas y preparaciones fitoterapéuticas, el problema asume una mayor gravedad, puesto que la proporción entre los componentes activos estará alterada. (Sharapin Nikolai. 2000).

❖ **Contaminación microbiológica.**

La contaminación biológica involucra problemas al usuario de drogas vegetales, debido a que puede abarcar la contaminación por gérmenes patógenos, la producción de endotoxinas



bacterianas, micotoxinas y transformaciones microbianas de los constituyentes botánicos en compuestos tóxicos. (Sharapin Nikolai. 2000).

❖ **Contenido de pesticidas y contenido de materiales pesados superior al permitido.**

El aumento de la contaminación ambiental debido a los metales tóxicos y el uso indebido de pesticidas, inclusive en los cultivos de plantas medicinales, ha ocasionado un aumento del número de muestras que presentan residuos a los límites admitidos. El riesgo para el consumidor es mayor cuando se trata de materia prima para la obtención de extractos o productos fitoterapéuticos que ofrecen un número limitado de etapas de procesamiento. (Sharapin Nikolai. 2000)

Este riesgo se disminuye cuando se trata del aislamiento de productos naturales puros, objetos de muchas etapas durante las cuales los componentes tóxicos son eliminados en casi su totalidad. Los ensayos límites para metales pesados están descritos en la farmacopea. (Sharapin Nikolai ,2000)

Las Plantas medicinales representan un reto mucho mayor a la hora de evaluar la calidad del producto. Los problemas principales son los siguientes:

- Cada planta o extracto contiene muchísimos agentes fotoquímicos, tanto conocidos como desconocidos.
- Los materiales vegetales que pertenecen a una misma especie, pueden variar considerablemente en su perfil fitoquímico, según factores genéticos y geográficos e incluso la edad del material y las condiciones en que se ha almacenado.
- La forma en que se extrae el material vegetal, afecta al perfil químico del extracto de forma que productos fitoterapéuticos obtenidos a partir de diferentes extractos de una planta pueden obtener efectos variables.
- La cantidad de datos preclínicos y clínicos es relativamente limitada, y así, con frecuencia es difícil evaluar la dosis requerida para conseguir un efecto terapéutico.
- Pueden haber pocos datos sobre los componentes fitoquímicos reales responsables del efecto terapéutico, sin hablar de sus concentraciones requeridas en el material vegetal.



- El tipo de contaminantes hallados en el material vegetal es diferente de la que se puede encontrar con fármacos a base de una única sustancia química y su detección requiere métodos diferentes. (A.Raman, 2001)

A partir de esto, se puede ver que incluso aunque podamos producir un producto de calidad homogénea, es decir, que contiene la planta correcta, sin sustancias que adulteren y con niveles concretos de ciertos componentes, no hay garantía de eficacia, si no existen datos fiables relativos a los componentes, dosis y efectividad. Por otra parte, en plantas que se han venido empleando tradicionalmente con seguridad, puede ser posible al menos conseguir una seguridad óptima al garantizar la identidad correcta y la ausencia de impurezas tóxicas y contaminantes. (A.Raman, 2001).

4.4 Determinación o garantía de la calidad de los agentes fitoterapéuticos.

Podemos determinar al menos la seguridad, si no la eficacia, al garantizar que un agente fitoterapéutico cumple los siguientes criterios:

- Contiene la planta correcta o extractos derivados de la planta correcta, utilizando un procedimiento de extracción aceptable.
- No contiene impurezas o contaminantes.
- Contiene las concentraciones correctas de principios activos o de componentes característicos.

El desarrollo de métodos para garantizar los puntos anteriores requiere conocer la naturaleza de los materiales vegetales, sus contaminantes y sus principios activos. (A.Raman, 2001).

4.5 Identidad.

Es importante identificar los materiales vegetales por su nombre botánico correcto, es decir, el binomio latino, para evitar cualquier error de identificación. El uso de nombres comunes puede llevar a errores en la identificación, a veces con resultados mortales. En la medicina china tradicional, el nombre pin-yin se emplea a menudo para asignar a más de una planta botánicamente diferente, cuando estas tienen propiedades médicas similares. La



adulteración de las plantas *Stephania tetradra* con la especia tóxica *Aristolochia* provoca insuficiencia renal en algunas mujeres, lo que aparece simplemente porque ambas especies reciben el nombre de fang-ji. También ha habido múltiples casos de confusión a partir del término *ginseng* que se aplica a una variedad de especies de panax así como de *eleutherococcus*. (A.Raman, 2001).

4.6 Comprobación de la identidad correcta

Los métodos aplicados incluyen métodos botánicos y métodos químicos, se resumen a continuación:

- Macroscopía y microscopia, basadas en la presencia de las características botánicas correctas. Se puede aplicar al material botánico, pero no a los extractos.
- Perfil químico mediante cromatografía líquida de alto rendimiento – Perfiles de zonas comparados con las monografías publicadas o con muestras auténticas, aplicable tanto a material botánicos como a extractos.
- Pruebas líquidas químicas, basadas en la presencia de un grupo concreto de componentes, ejemplos, los extractos alcaloides dan un precipitado naranja con el reactivo de Drangendorff. (A.Raman, 2001).

4.7 Pureza.

Los contaminantes más comunes de las plantas medicinales, incluyen los siguientes:

- Otras partes de la misma planta.
- Partes de otras plantas, a menudo con un gran parecido con la planta de interés.
- Tierra y piedras procedentes del cosechado o como adulteración deliberada.
- Contaminantes medioambientales: Metales pesados, pesticidas, radioactividad.
- Contaminación microbiana por el ataque de bacterias u hongos.
- Insectos por ejemplos: Escarabajos u Orugas
- Animales por ejemplo roedores y sus excrementos. (A.Raman,2001).

4.8 Acerca de las buenas prácticas de manufactura de fitofármacos



Las buenas prácticas de manufactura, son pautas universales aplicadas en la producción farmacéutica. Los fitofármacos no tienen consideraciones especiales, pero existen algunas peculiaridades en el complejo de la producción y del control de calidad de los mismos. (Menéndez Castillo, Rosa, 2001)

Presentamos un resumen de los aspectos relacionados con el Control de Calidad, considerados en las pautas adicionales a las buenas prácticas de manufactura conformadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS):

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

- Nombre botánico.
- Detalle 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 micro morfológica.
- 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.

Cualquier tratamiento utilizado para reducir la contaminación debe ser documentado. Los detalles del proceso deben ser reflejados, así como los límites de los residuos. (Menéndez Castillo, Rosa, 2001)

4.10 Con relación a las especificaciones del Producto Final, se exige que:



El ensayo de control, debe ser tal que refleje la determinación cualitativa y cuantitativa de la composición de los ingredientes activos y las especificaciones son dadas utilizando marcadores si se desconocen los constituyentes activos, de lo contrario, deben especificarse y determinarse cuantitativamente.

Si el producto final contiene más de una materia vegetal o preparaciones de diversas drogas vegetales y no es posible la determinación cuantitativa de cada ingrediente, se efectúa la evaluación de la mezcla total. (Menéndez Castillo, Rosa, 2001)

4.11 Materia prima utilizada en los fitofármacos a evaluar.

4.11.1 Hierba de San Juan.

El *Hypericum Performatum*, es originaria de Europa es de flores amarillas y tallos largos, pertenece a la familia de las *Hypericaceae*.

Tiene aplicaciones diuréticas y en el tratamiento de desórdenes menstruales gracias a sus hojas y ápices que son las partes más utilizadas de la planta.

Es utilizada de forma tópica para curar heridas; su uso se extiende para alteraciones nerviosas, perturbaciones del sueño, antidepresivo, antimicrobianas, antiviral, cardiotónica.

Sus principales componentes son:

- Pigmentos naftodiantronas.
- Flavonoides tales como: rutina, hiperina etc.
- Biflavonoides.
- Aceites esenciales.
- Fenoles: Clorogénicas y epicatequinas.

(Muñoz Orlando; Montes Marco; Wilkomirsky Tatiana. 2004).



4.11.2 Caléndula.

La *Caléndula Officinalis L.* proviene de la palabra latina Kalendae (calendas primer día del mes), usada por los antiguos romanos para indicar la floración durante el año en una zona. (Fonnegra G Ramiro, Jiménez R Silva Luz. 2007).

Su aplicación más importante es como medicina en fitoterapia; gracias a las flores que son su parte útil.

En el uso interno, la caléndula resulta adecuada como colagogo, hipotensor, emenagogo y vasodilatador.

En el uso externo, sirve como antiséptico, fungicida (gracias a su contenido en lactonas terpenicas y alcoholes dando un excelente resultado frente a estafilococos y tricomonas), antiinflamatorio y como dermatoprotector.

Los principios activos que se encuentran en las plantas son:

- Aceites esenciales
- Carotenoide
- Alcohol Terpenico



- Calendina
- Flavonoides
- Ácido Salicílico
- Saponosidos

(Roldan A. Alfredo 2004.)



4.11.3 Valeriana

La *Valeriana officinalis* es una planta perenne, perteneciente de la familia *Valerianaceae*, es originaria de Europa y Asia donde generalmente crece en lugares húmedos. Su parte utilizada es el rizoma y la raíz las cuales tienen propiedades tranquilizantes, expectorante, antiespasmódica, diurética, hipnótica. Dentro de sus usos están las formas más comunes como son Decocción y la compresa. (Ramiro Fonnegra G, Fonnegra Gómez Fonnegra G., Jiménez Ramírez Jiménez R, 2007).

Sus propiedades calmantes, lo hacen útil en estados de agitación nerviosa y dificultades para conciliar el sueño. (Ramiro Fonnegra G, Fonnegra Gómez Fonnegra G., Jiménez Ramírez Jiménez R, 2007)

Por su efecto antiespasmódico, resulta útil para combatir los calambres y cólicos intestinales, también alivia las molestias de la menstruación (retorcijones y dolores). (Sosa Gómez Reynaldo, 1998).



Como toda planta, presenta complicaciones en su uso prolongado produciendo dolor de cabeza, mareo, visión borrosa, desasosiego y atontamiento al despertar. (Sosa Gómez Reynaldo, 1998).



4.11.4 Carao

Cassia grandis L. Popularmente conocida como Cañadonga, es un árbol al cual se le atribuyen propiedades antianémicas. Es un árbol de hasta 30 metros de alto con extensas ramas nativo de Centro América, Caribe y norte de Sudamérica, encontrándose en terrenos abiertos, bordes de caminos y pastizales. (LAGARTO PARRA, Alicia y GUERRA SARDINAS, María Isabel, 2000)

Las hojas contienen antraquinonas (aloe-emodina, ácido crisofánico, fisción, reina), barakol, flavonoides (kampferol), leucoantocianinas y saponinas. En el fruto se ha encontrado ácido cinámico y azúcares. Las semillas contienen flavonoides y polisacáridos. (LAGARTO PARRA, Alicia y GUERRA SARDINAS, María Isabel, 2000)

La decocción de hojas, fruto y corteza se usa por vía oral para tratar la anemia, hemorragia nasal, enfermedades del hígado, infección urinaria, histeria, resfrío y tos.

Por vía tópica, se puede aplicar un ungüento de hojas para tratar afecciones dermatomucosas (herpes, llagas, tiña, vitíligo). De la raíz se extrae un líquido antiséptico



utilizado en la cura de heridas, la corteza es utilizada como cicatrizante. (LAGARTO PARRA, Alicia y GUERRA SARDINAS, María Isabel, 2000)

A las hojas y fruto, se le atribuye propiedad anti anémica, antimicótica, antiséptica, astringente, depurativa, diurética, estimulante, expectorante, febrífuga, galactogoga, laxante, mineralizante, pectoral, purgante, sedante y tónica. A la raíz se le atribuye propiedad febrífuga, purgante y tónica. (LAGARTO PARRA, Alicia y GUERRA SARDINAS, María Isabel, 2000)



4.12 Microorganismos implicados en este estudio.

4.12.1 Género *Escherichia*

Este género está compuesto por *E.Coli* y varios biotipos. Los microorganismos, según su grupo pueden ser móviles o inmóviles. Fermentan la glucosa y la lactosa, con producción de gases (CO_2 , H_2 , en la porción 1:1). (Martin Frobisher et. Al, 1978)

El CO_2 y el H_2 producidos por el *E.Coli* derivan del ácido fórmico a través de la acción de la enzima hidrogenilasa formica, dando como resultado la producción de igual cantidad de moles de CO_2 y de H_2 . (Martin Frobisher et. Al, 1978)

La mayoría de las cepas están rodeadas por micro cápsulas y muchas cepas poseen cilios. Su presencia en los alimentos o en el agua potable puede ser indicio de contaminación fecal. La *Escherichia Coli* es la especie más genuinamente fecal, y siempre se encuentra en



el conducto intestinal. Algunas cepas de *E.coli* causan diarreas que van de ligeras a graves. (Martin Frobisher et. Al, 1978)

4.12.2 Género *Pseudomonas*

Los miembros de este género son las bacterias más comunes y ampliamente distribuidas. Son enzimáticamente activas y metabolizan alrededor de unos 100 compuestos orgánicos diferentes para las fuentes de carbono y de energía. Una sola cepa de *P. aeruginosa* puede hacer uso de una gran variedad de proteínas, grasas, hidratos de carbono y otros compuestos orgánicos, incluyendo compuestos como el fenol, el naftaleno y los hidrocarburos. Por ende, son excelentes destructores de la materia orgánica. Son principalmente aerobias; algunas suelen ser facultativas. (Martin Frobisher et. Al, 1978)

Se encuentran en el suelo, en el agua corriente, en las aguas residuales y en el agua del océano donde pueden descomponer el pescado y otras materias orgánicas. (Martin Frobisher et. Al, 1978)

Pseudomona Aeruginosa es la especie prototipo del género. Además de producir un pigmento amarillo verdoso que es característico de muchas *Pseudomonas*, estas producen varios pigmentos solubles en agua:

-Pigmento azul turquesa, la piocianina (del grupo *pyo=pus*, y *cyanin=azul*), este puede extraerse de los caldos de cultivo con cloroformo.

-Pigmento verde fluorescente, la pioverdina.

-Pigmento fluorescente rojo o rubí, la piorrubina.

-Pigmento marrón, soluble en agua, la piomelanina. Este se produce en medios que tengan tirosina o fenilalanina.

Las cepas de *P.aeruginosa* altamente patógenas crecen muy poco a 30°C, pero a temperaturas entre 37 y 42°C su crecimiento es mayor. Las patógenas de las plantas (el grupo fluorescente) prefieren temperaturas más bajas.



Las mayorías de las cepas de *P.aeruginosa* tienen un solo flagelo polar, algunas cepas cuando son cultivadas en medio agar, producen placas parecidas a los fagos (auto placas) de autólisis. (Martin Frobisher et. Al, 1978)

4.12.3 Género Staphylococcus

El Staphylococcus tiene la capacidad de utilizar en condiciones anaerobias la glucosa, el manitol y el piruvato por su sensibilidad a la lisostafina. Las células de los Staphylococcus son un poco más pequeñas que la de los micrococos. Los Staphylococcus se encuentran en general en la piel y en las membranas mucosas del cuerpo animal, especialmente en la nariz y la boca, donde se presentan a menudo en gran cantidad, incluso en condiciones normales. Hay dos especies principales *Staphylococcus aureus*, que se distinguen sobre todo por su pigmento dorado, es notario como productor de enfermedades supurativas (piojenos, o formador de pus): mastitis, de la mujer y de las vacas, furúnculos, ántrax, impétigo infantil, abscesos internos e intoxicaciones alimentarias. El S. epidermis (S. albus) es menos patógenos o comensal de la piel y de las membranas mucosas. (Martin Frobisher et. Al, 1978)

Staphylococcus Aureus: Los Staphylococcus aislados del material patógeno son en general, *S. Aureus* estos cocos, clásicamente:

1. Fermentan el manitol y la lactosa.
2. Son Proteolíticos.
3. Producen coagulosa (Principio enzimático que hacen que el plasma sanguíneo citratado se coagule)
4. Producen pigmento dorado.
5. Producen lipasa.
6. Forman amplias zonas de hemólisis. (V. Streptococo) aerobiamente en las placas de agar sangre.
7. Crecen en medios que contengan un 10% de cloruro sódico. (Martin Frobisher et. Al, 1978)



S. Aureus puede aislarse del material contaminado cultivándolo en un medio selectivo de caldo de proteína digerida que contenga un 10 % de cloruro sódico. En crecimiento en tal líquido selectivo puede sembrarse en el “medio estafilocócico 110”. Este medio está designado para seleccionar *Staphylococcus Áureo* y mostrar algunas propiedades diferenciales. Contiene:

- a. Proteína Ligera (Trip-ticasa o Triptona), 1%.
- b. Extracto de levadura, 0.25%.
- c. Gelatina, 3%.
- d. D-Manitol, 1%.
- e. Lactosa, 0.2%.
- f. NaCl, 7.5%.
- g. K₂ HPO₄, 0.5%.
- h. Agar, 1.5%.

Puede añadirse rojo fenol como indicador. También puede servir agar simple con 1% de manitol 7.5% NaCl. Las colonias diferenciales de este medio pueden trasladarse a cultivos puros para la prueba de producción de coagulasa. (Martin Frobisher et. Al, 1978).

4.12.4 Género *Salmonella*

Este género consiste en células de formas bacilares, habitualmente móviles y capaces de utilizar el citrato como fuente de carbono.

Algunas de las especies reconocidas de *salmonella* más comunes son:

Grupo A

S. Paratyphi-A

S. Senftenberg

Grupo B

S. Paratyphi-B

S. Typhi-Murium

S. Heidelberg



Grupo C

S. Paratyphi-C

S. Cholerae-Suis

S. Thompson

Grupo D

S. Typhi

S. Enteritidis

S. Sendai

(Martin Frobisher et. Al, 1978)

Los miembros de este género no fermentan la lactosa, producen sulfuro de hidrogeno a partir de tiosulfato y producen gases visibles al fermentar azucares. (Jhon L. Ingraham, Catherine A. Ingraham, 1998)

Salmonella thypi es el agente responsable de fiebre tifoidea, una infección intestinal febril, potencialmente mortal. Los microorganismos de esta especie se diferencian de las demás especies de *salmonella* en que solo afectan a los seres humanos. (Jhon L. Ingraham, Catherine A. Ingraham, 1998)

La salmonelosis, es una infección alimentaria producida como consecuencia de la multiplicación de las bacterias que se encuentran en el intestino. Esta enfermedad es producida por varios tipos de *salmonella*, tradicionalmente clasificadas como *S. Enteritidis* o *S. Cholerae-Suis*. Esta infección inicia cuando las personas ingieren grandes cantidades de salmonelas que invaden el epitelio del intestino delgado en donde se multiplican. (Jhon L. Ingraham, Catherine A. Ingraham, 1998)

4.12.6 Hongos y levaduras.

En el campo de la microbiología industrial se estudia tanto la acción nociva de los hongos en los alimentos y productos manufacturados, como el empleo de estos organismos en fermentaciones industriales en el campo de la biotecnología. Pertenecen a grupos



taxonómicos muy diversos, aunque se pueden observar a simple vista, estos producen estructuras diminutas, reproductoras y vegetativas, que no es posible estudiar sin ayuda del microscopio. Comúnmente se da en nombre de moho a ciertos hongos multicelulares filamentosos, dotados de un micelio verdadero y cuyo crecimiento se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. Por esta razón no es seguro establecer el límite entre hongos y ciertos organismos productores de esporas y de micelios de las levaduras. (Pascual A. María del Rosario. 2000)

Las levaduras son hongos que crecen generalmente en forma de agregados sueltos de células independientes, que pueden ser globosas, ovoides, piriformes, alargadas o casi cilíndricas. En algunos casos, forman cadenas de células alargadas adheridas de moho suelto, semejante a un micelio, por lo que se les denomina pseudomicelio. Algunas especies forman breves extensiones de verdadero micelio, con frecuencia ramificado. De acuerdo con lo anterior, según se ha comentado, no existe un límite de separación definido entre las levaduras y otros hongos que forman un micelio típico. (Pascual A. María del Rosario. 2000)

Las levaduras, cuando crecen sobre medios sólidos, forman colonias de aspecto característico que recuerda a las colonias bacterianas. En casi todas las especies de interés industrial, la manera general de reproducción vegetativa es por gemación. Muchas de ellas presentan reproducción sexual por medio de ascosporas, a diferencia de los hongos, las levaduras no pueden identificarse solamente por sus caracteres morfológicos; se precisa de ayuda de pruebas bioquímicas para la identificación específica. (Pascual A. María del Rosario. 2000)

4.12.7 Bacterias aerobias mesófilas.

Son aquellas que tienen su mayor velocidad de crecimiento a temperaturas comprendidas entre 25 a 45°C. Esta clase comprende la mayor parte de los organismos que tienen como huésped al hombre y otros animales de sangre caliente. Estos organismos pueden crecer a temperaturas más bajas pero presentando un crecimiento lento. (P.P Manuel de la Rosa José.1997)



Sus condiciones ambientales de crecimiento son:

- ✓ **Oxígeno:** Estas bacterias que son capaces de utilizar oxígeno como aceptor final de electrones en su cadena respiratoria crecen en la atmósfera habitualmente conteniendo 21% de Oxígeno.
- ✓ **Temperatura:** Es un factor importante para el crecimiento óptimo por su velocidad de crecimiento debe estar entre 20 a 40°C
(P.P Manuel de la Rosa José.1997)

4.13 Prueba de límite microbiano

Es el recuento de los microorganismos viables presentes en una muestra no estéril, para determinar si se encuentra dentro de los límites establecidos. (Reglamento técnico centroamericano NSO RTCA 11.01.35:06)

La USP 36 define que las pruebas de límites microbianos son utilizadas para estimar el número de microorganismos aerobios viables presentes en una muestra y para determinar la ausencia de especies microbianas designadas en artículos farmacéuticos de todo tipo, desde materias primas hasta productos finales. (USP 36, NF 31, Farmacopea de los estados unidos de América.2007)



5. Hipótesis

Las cuatro formas fitoterapéuticas evaluadas en este estudio poseen una óptima calidad microbiológica.



6. Material y método

Diseño Metodológico

Tipo de estudio: el presente estudio es de tipo experimental.

Área de estudio: Departamento de Farmacia industrial, área de microbiología, ubicado en el segundo piso de la facultad de Ciencias Químicas, Campus Medico, UNAN-LEON.

Universo de Estudio:

- ❖ Jarabes de carao “CARAO-VID” que se expenden en el “Centro Botánico para su Salud”.
- ❖ Cápsulas de Hierba de San Juan “Hierba de San Juan St. John’S Wort” que se expenden en el “Centro Botánico para su Salud”.
- ❖ Pomadas de Caléndula “Pomada Dermoflor” que se expenden en el “Centro Botánico para su Salud”.
- ❖ Gotas orales de valeriana “Valeriana” que se expenden en el “Centro Botánico para su Salud”.

Muestra:

- ❖ Once Frascos de 60mL de jarabe de carao “CARAO-VID”. Con número de lote: 109567 que se expenden en el “Centro Botánico para su Salud”
- ❖ Once Frascos que contienen cada uno 40 cápsulas de 500mg de hierba de San Juan “Hierba de San Juan St. John’S Wort” Con número de lote: 423.
- ❖ Once tubos de 30gr de pomada de caléndula “Pomada Dermoflor” que se expenden en el “Centro Botánico para su Salud” Con número de lote: 30813005.
- ❖ Once Frascos de 30mL de gotas orales de valeriana “Valeriana” que se expenden en el “Centro Botánico para su Salud”. Con número de lote: 16M14.

Tipo de muestreo: No probabilístico por conveniencia, debido a que nos permite establecer criterios para seleccionar la muestra, la cual fue obtenida mediante una entrevista



realizada a los dueños de centros naturistas de la ciudad de León, donde nos informamos cuales son los fitofármacos de mayor demanda por la población.

Criterios de inclusión:

- Fitofármacos más utilizados por la población.
- Fitofármacos sin registro sanitario.
- Fitofármacos que se expenden en los centros naturistas de la ciudad de León.

Criterios de exclusión:

- Fitofármacos comercializados fuera de la ciudad de León.
- Fitofármacos menos utilizados por la población.
- Fitofármacos que se comercializan en mercados y ambulatoriamente en la ciudad de León.
- Fitofármacos sin número de lote.

Selección de la muestra: Se realizó una entrevista no estructurada a los propietarios de los centros botánicos ubicados en la ciudad de León. Considerando que se desconoce la cantidad de locales de venta de fitofármacos se seleccionaron 10 centros botánicos, considerados los más conocidos y representativos de la ciudad. La entrevista permitió establecer los cuatro fitofármacos de mayor venta y por tanto de mayor uso de la población de la ciudad, sobre esto se constituyó la muestra del estudio.

Para adquirir las muestras tomamos como referencia uno de los diez centros botánicos entrevistados, considerado el más conocido por la población, ya que está ubicado en un punto central de la Ciudad.

- “Centro Botánico para su Salud” ubicado costado sur del Colegio La Salle.

De este centro naturista se hizo la adquisición de nuestra muestra que serán once frascos de cada uno de los fitomedicamentos seleccionados para este estudio.



Análisis de la muestra: Se realizaron ensayos para cada uno de los microorganismos implicados.

Microorganismos	Ensayos
Bacterias Aerobias mesófilas.	• Conteo total.
<i>Staphylococcus aureus</i> .	• Determinación de ausencia.
<i>Escherichia coli</i> .	• Determinación de ausencia.
<i>Salmonella</i> especies.	• Determinación de ausencia.
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> .	• Determinación de ausencia.
Hongos y levaduras.	• Conteo total combinado para hongos y levaduras.

Análisis de resultados: Este estudio es de carácter descriptivo por lo tanto el análisis de los resultados se realizara a través de tablas comparativas. Se utilizara Microsoft Excel para procesar los datos obtenidos.

6.1 Operacionalización de variables.

Variables	Definición	Indicadores	Índices según la RTCA 11.03.56:09	Índices según USP 36 NF 31
• <i>Staphylococcus aureus</i> .	Se distinguen sobre todo por su pigmento dorado, es notario como productor de enfermedades supurativas (piojenos, o formador de pus): mastitis, de la mujer y de las vacas, furúnculos, ántrax, impétigo infantil, abscesos internos e	Determinación de ausencia.	Ausencia.	Ausencia



	intoxicaciones alimentarias.			
• <i>Escherichia Coli.</i>	Es la especie más genuinamente fecal, y siempre se encuentra en el conducto intestinal. Algunas cepas de <i>E.coli</i> causan diarreas que van de ligeras a graves.	Determinación de ausencia.	Ausencia.	Ausencia.
• <i>Salmonella Especies</i>	Este género consiste en células de formas bacilares, habitualmente móviles y capaces de utilizar el citrato como fuente de carbono.	Determinación de ausencia.	Ausencia.	Ausencia.
• <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	Es la especie prototipo del género. Además de producir un pigmento amarillo verdoso que es característico de muchas <i>Pseudomonas</i> , estas producen varios pigmentos solubles en agua	Determinación de ausencia.	Ausencia.	Ausencia.
• Bacterias Aerobias Mesófilas.	Esta clase comprende la mayor parte de los organismos que tienen como huésped al hombre y otros animales de sangre caliente.	Conteo total para Bacterias Aerobias Mesófilas..	No más de 10^4 bacterias aeróbicas/g o por mL	Picado $\leq 10^5$ UFC Extracto $\leq 10^4$ UFC Decocción $\leq 10^2$ UFC
• Hongos y levaduras.	Comúnmente se da en nombre de moho a ciertos hongos multicelulares filamentosos, dotados de un micelio verdadero y cuyo crecimiento se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. Por esta razón no es seguro establecer el límite entre hongos y ciertos organismos	Conteo total combinado para hongos y levaduras.	No más de 10^2 hongos/g o por mL.	Picado y extracto $\leq 10^3$ UFC Decocción ≤ 10 UFC



	<p>productores de esporas y de micelios de las levaduras.</p> <p>Las levaduras son hongos que crecen generalmente en forma de agregados sueltos de células independientes, que pueden ser globosas, ovoides, piriformes, alargadas o casi cilíndricas.</p>			
--	--	--	--	--

6.2 Material y equipo

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

- Cristalería marca PYREX
- Cocina marca CORNING, HOT PLATE PC-100
- Incubadora doble marca Precision Scientific.
- Balanza marca OHAUS de 2610gr, TRIPLE BEAM BALANCE.
- Autoclave para descontaminar cristalería marca Electric Steroclave, 25x
- Autoclave para esterilizar medios marca Pelton & Crane.
- Horno marca PRECISION, GSA Corporation.
- Mechero marca HUMBOLDT
- Agitador eléctrico marca SCIENTIFIC INDUSTRIES, INC.
- Contador de colonias marca AO, Scientific Instruments, Quebec Colony Counter.
- Espectrofotómetro marca SPECTRONIC 20, BAUSH LOMB
- Baño maría marca PRECISION, GCA Corporation 45:5°C
- pHmetro.

Equipo metálico

- Espátula.
- Asa de Henle.



- Gradillas metálicas.

Material de laboratorio descartable

- Algodón.
- Papel aluminio.
- Guantes.
- Boquillas.
- Zapatos quirúrgicos.
- Gorros quirúrgicos.

Reactivos

- Agar caseína-soya.
- Caldo caseína-soya.
- Caldo lactosado.
- Caldo tetrionato.
- Agar sulfito de bismuto.
- Agar MacConkey.
- Agar levine-eosina-azul de metileno.
- Selenito-Cistina.
- Agar Sabouraud.
- Agar Baird Parker.
- Agar Cetrimide.
- Fosfato Monobásico.



7. Procedimiento

Se tomarón aproximadamente 10ml o g de cada una de nuestras muestras, se llevaron a un Erlenmeyer previamente esterilizados para realizar el pool.

De nuestro pool se tomó una alícuota de 10ml o g y se llevó a un Erlenmeyer que contenía 90 ml de fosfato monobásico a pH7. De este se tomó una alícuota de 1ml y se añadió a placas estériles luego se agregó aproximadamente de 15 a 20 ml de ADCS, se homogenizaron las placas quince veces en forma de ocho para determinar la presencia de Bacterias Aerobias Mesófilas, se dejaron incubando a una temperatura de 36-37°C por 48 horas.

De nuestro mismo fosfato monobásico que contiene 10 g o ml de la muestra se tomó una alícuota de 1ml y se añadió a placas estériles, para luego agregar aproximadamente 15 a 20ml de Agar Saboround, se homogenizaron las placas quince veces en forma de ocho para la determinación de hongos y levaduras, incubándose de 20 a 22°C de 5-7 días.

De nuestro pool se tomaron 10 g ó ml y se añadieron a 90ml de caldo lactosado el cual fue previamente encubado a 36°C por 24 horas, preenriqueciendo los microorganismos *salmonella* y *e.coli*. De este caldo se tomó una alícuota de 1ml que fue llevado a un tubo de ensayo que contenía 9ml de Caldo Selenito Cistina este procedimiento se hace para enriquecer el microorganismo *salmonella*.

Con ayuda de un asa de platino estéril se tomó del Caldo Selenito Cistina, previamente incubado de 36-37°C por 24 horas una asa y se raya en placas que contenían Agar XLD para la determinación de *Salmonella*, dejando incubar de 18-24 horas a temperatura de 43-45°C.

Del Caldo Lactosado se toma una asa y se rayó en placas que tenían Agar EMB para la determinación de *E.coli*, y se dejó incubando por 18- 24 horas a temperatura de 43-45°C.



De nuestro pool se tomaron 10 g ó ml y se añadieron a un Erlenmeyer que contenía Caldo DCS fue incubado a 36°C por 24 horas preenriqueciendo los microorganismo Pseudomona aeruginosa y Staphylococcus aureus.

De este caldo se tomó una asaa y se rayó en placas que contenían Agar Baird Parker para la determinación de Staphylococcus aureus y se dejó incubando por 24 horas a 36°C.

Del mismo caldo de DCS nuevamente se toma una asaa y se raya en placas que contenían Agar Cetrimide para la determinación pseudomonas aeruginosa y se dejó incubando por 24 horas a 36°C.

8. Niveles microbianos.

Las recomendaciones sobre la calidad microbiológica de los fitomedicamentos se encuentran dadas en la Farmacopea USP 36 NF 31 volumen 1, artículo <2023> “Los atributos microbiológicos de no estéril, nutricional y suplementos dietéticos”.

Según la USP 36 NF 31		
Material	Definición	Especificaciones
Picado o en polvo	Hojas, flores, raíces, tubérculos que se secan al aire y picado en copos, seccionado o pulverizado a la consistencia de un polvo	Bacterias Aerobias Mesófilas $\leq 10^5$ Hongos y Levaduras $\leq 10^3$
Extractos Botánicos	Son sólidos o preparaciones semisólidas	Bacterias Aerobias Mesófilas $\leq 10^4$. Hongos y Levaduras $\leq 10^3$
Decocción	Son soluciones de ingredientes botánicos preparados por ebullición del material	Bacterias Aerobias Mesófilas $\leq 10^2$. Hongos y Levaduras ≤ 10

Según el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.56:09

“Evaluación de la calidad microbiológica de cuatro formas fitoterapéuticas que se expenden en los diferentes centros botánicos de la ciudad de León”.



Especificaciones para determinación de recuento microbiano		
Producto Natural	Recuento total de aerobios viables	Recuento total de hongos y levaduras
Preparación de administración oral	$\leq 10^4$	$\leq 10^2$
Preparaciones de administración tópica	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$

Las pruebas de límite microbiano se encuentran en el artículo <2021> de la USP y contienen ensayos para la estimación del número de microorganismos aerobios viables presentes y la ausencia de especies microbianas específicas en materia prima como en producto terminado. El término “crecimiento” es utilizado en un sentido especial aquí, para designar la presencia y presumible proliferación de microorganismos viables. (Solis N Pablo, Guerrero Solis. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)

9. Pruebas preliminares

La validez de los resultados de las pruebas descansa fundamentalmente en la demostración de que las pruebas bajo ensayo, no inhiben el crecimiento de microorganismos que puedan estar presentes. Por lo tanto, previo a la realización de la prueba de límite microbiano y de acuerdo a como lo requieran las circunstancias, es necesario inocular porciones diluidas de la muestra con diferentes cultivos, tales como:

- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Salmonella* especies.
- *Pseudomonas Aeruginosa*

Esto se puede lograr añadiendo la primera dilución en amortiguador fosfato pH 7.2, caldo de Caseína Soya o caldo Lactosado de la muestra en estudio, 1.0 mL de una dilución de 10^3 de un cultivo de 24 horas y siguiendo el procedimiento descrito. En caso de que los



organismos no crezcan en el medio apropiado, invalida esta parte de la prueba y el procedimiento requiere de una modificación:

- Un aumento en el volumen del diluyente, manteniendo la cantidad de la muestra igual o,
- La incorporación de una cantidad suficiente de agente inactivador en los medios diluyentes.
- Una apropiada combinación de modificaciones (dilución e inactivación), de manera que se permita el crecimiento del inóculo. (Solís N Pablo, Guerrero Solis. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)

Algunos agentes inactivadores de sustancias inhibitorias son:

- La Lecitina de Soya al 0.50%
- Polisorbato 20 al 4%

Por lo anterior, se debe repetir la prueba como ya fue descrita, utilizando caldo de Polisorbato 20- Lecitina de Soya-caseína para demostrar la neutralización de los agentes preservantes u otros antimicrobianos presentes en el material bajo estudio. (Solís N Pablo, Guerrero Solis. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)

10. Preparación de las muestras

Preparar la muestra de acuerdo al tratamiento que sea apropiado a sus características físicas y que no altere el número y clase de microorganismos presentes originalmente, para obtener una solución o suspensión de una parte o toda la muestra, en una forma adecuada para la prueba o pruebas que se van a realizar. (Solís N Pablo, Guerrero Solis. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)

La preparación de especímenes de 10 ml o de 10 gramos para cada una de las muestras que especifica la monografía a continuación:

En el caso de un sólido que se disuelva apropiadamente, pero no completamente, reducir la muestra a un polvo moderadamente fino, suspender en el vehículo indicado y proceder tal como se especifica en conteo Microbiano Total Aeróbico y bajo prueba para



Staphylococcus aureus y para pruebas específica para especies de *Salmonella* y *Escherichia coli*. (Solis N Pablo, Guerrero Solis. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)

Para un líquido fluido que es una verdadera solución o una suspensión en agua o vehículo hidroalcoholico el cual contiene menos del 30% de alcohol, a diferencia de un sólido que se disuelve fácilmente y casi completamente en 90ml de amortiguador de fosfato pH 7.2 o en un medio especificado, proceder como se indica bajo Conteo Microbiano Total Aeróbico y bajo pruebas para *Staphylococcus aureus* y para pruebas específica para especies de *Salmonella* y *Escherichia coli*. (Solis N Pablo, Guerrero Solis. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)

Para productos tales como: Ceras, Cremas y ungüentos miscibles en agua, preparar una suspensión con la ayuda de una cantidad mínima de un agente emulgente estéril apropiado. Para lograr esto es necesario utilizar:

1. Licuadora Mecánica
2. Calentar a una temperatura no mayor de 45°C

Así es necesario y proceda con la suspensión tal como se indica bajo Conteo microbiano Total Aeróbico y bajo pruebas *Staphylococcus aureus* y pruebas para especies de *Salmonella* y *Escherichia coli*. (Solís N Pablo, Guerrero Solís. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)

11. Conteo microbiano total aeróbico.

Para muestras que son suficientemente solubles o translúcidas es necesario utilizar método en placa o el método de tubos múltiples. Ambos métodos requieren que se disuelvan o suspendan 10.0 gramos de la muestra, si ésta es un sólido o bien 10ml, medidos por precisión en caso de ser un líquido, en amortiguador fosfato pH 7,2 utilizando caldo soya caseina o caldo caseina- lecitina de Soya- polisorbato 20 para hacer 100ml. (Solís N Pablo, Guerrero Solís. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)



Para el caso que fueran muestras viscosas que no pudieran ser pipeteadas en esta dilución inicial 1:10, se continuara diluyendo (1:50 o 1:100 o mas), hasta conseguir una dilución que permita hacerlo. (Solís N Pablo, Guerrero Solís. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)

Realizar un ensayo para ausencia antimicrobiana tal como se describe ante las pruebas preliminares antes de la determinación del conteo microbiano total aeróbico.

Se adiciona el inocuo al medio en un periodo de tiempo no mayor de una hora, luego de preparar las diluciones apropiadas. (Solís N Pablo, Guerrero Solís. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)

11.1 Método en placa

1. Diluir el medio de tal manera que 1ml produzca un crecimiento de 30 a 300 colonias. Pipetear 1ml de la disolución final a cada una de las placas.
2. Añadir a cada placa 15 a 20ml de Agar Caseina-Soya que ha sido fundido y enfriado a 45°C.
3. Cubrir las placas de petrie.
4. Mezclar la muestra con el agar por el medio de rotación y permitir que el contenido se solidifique a temperatura ambiente.
5. Invertir las placas petrie e incubar durante 48 a 72 hrs.
6. Posterior a la incubación, examinar las placas para determinar si existe presencia de crecimiento.
7. Contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por gramo o por ml de la muestra.

Si no se recuperan colonias en las placas que representan la dilución inicial 1:10, expresar el resultado como: **<10 microorganismos/g o por ml de muestra.** (Solís N Pablo, Guerrero Solís. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)

11.2 Ensayo para Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa.

Para este ensayo se requiere:

1. A la muestra añadir Caldo Caseina de Soya para hacer 100 ml, mezclar e incubar.



2. Examinar el medio para determinar si hay crecimiento, si resulta positivo, utilizar un asa para tomar una porción y rayar sobre la superficie de agar Vogel- Johnson (o agar Bair-Parker o Manitol-Sal) y sobre agar Cetrimida.
3. Cubrir e invertir las placas de petrie e incubar.

Si posteriormente a examinar ninguna de las cajas presenta colonias con las características que aparecen en la tabla uno y dos (VER ANEXO) para el medio utilizado, las muestras entonces cumplen con los requerimientos para ausencias de *Staphylococcus Aureus* Y *Pseudomonas Aeruginosa* (Solís N Pablo, Guerrero Solís. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)

11.3 Prueba de coagulasa (*Staphylococcus aureus*)

Con la ayuda de una ASA:

1. Transferir colonias sospechosas y representativas de la superficie del agar Vogel- Johnson (o agar Bair- Parker o Manitol-Sal) a tubos individuales que contengan 0.5ml de plasma de mamífero, preferiblemente de conejo o de caballo con o sin aditivos apropiados.
2. Incubar en Baño María a 37°C examinando los tubos a las tres horas y posteriormente a intervalos apropiados hasta las 24 horas.
3. Realizar controles positivos y negativos simultáneamente con los microorganismos desconocidos.
4. Si no se observa ningún grado de coagulación entonces la muestra cumple con los requerimientos de la prueba para ausencia de *S. aureus*. (Solis N Pablo, Guerrero Solis. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando,)

11.4 Prueba de oxidasa y pigmentos (*Pseudomonas aeruginosa*).

1. Con la ayuda de un ASA escoger colonias sospechosas y representativas de la superficie del agar Cetrimida y rayar sobre la superficie de agar Pseudomonas para la detección de fluoresceína y Agar Pseudomonas para la detección de piocianina.



2. Si se deben transferir numerosas colonias, dividida la superficie de cada plato en cuadrantes y en cada uno inocule una de las colonias.
3. Cubrir el plato petrie.
4. Invierta e incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por no menos de tres días.
5. Examinar la superficie rayada bajo U.V.
6. Examinar los platos para determinar si existen colonias con las características descritas.
(Solis N Pablo, Guerrero Solis. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)

11.5 Prueba para determinar la ausencia de *Salmonella pp* y *Escherichia coli*.

Para lograr determinar la ausencia de *Salmonella Spp* y *Escherichia Coli* es necesario:

1. A la muestra colocada en un recipiente añadir un volumen de Caldo lactosado para hacer 100 ml e incubar.
2. Examinar el medio en busca de crecimiento y si lo hay mezclar suavemente.
3. Pipetear porciones de 1ml a recipientes que contengan 10ml de Caldo Selenito-Cisteína y Caldo de Tetrionato respectivamente e incubar de 12 a 24 hrs (**NO DESACARTAR EL SOBRENTE DEL CALDO LACTOSADO**). (Solis N Pablo, Guerrero Solis. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)

11.6 Prueba para determinar la ausencia de *Salmonella pp*.

1. Utilizando un asa tomar de los caldos de selenito-cisteína y tetrionato y rayar sobre la superficie de agar Verde Brillante, agar Xilosa- Lisina- Desoxicolato y agar sulfito de Bismuto.
2. Cubrir e invertir los platos e incubar.
3. Examinar los platos, si ninguna de las colonias coincide con las con las características morfológicas presentadas en la tabla tres (VER ANEXO) entonces la muestra cumple con los requerimientos de la prueba para la ausencia del genero *Salmonella*.



4. Si se observan bacilos gramnegativos proceder con una identificación más exhaustiva, transfiriendo colonias representativas sospechosas, individualmente con la ayuda de una asa para inoculación, a un tubo inclinado que contiene agar triple Azúcar –Hierro.
5. Rayar primero la superficie inclinada y enterrando el asa debajo de la superficie.
6. Incubar.
7. Si al examinar el tubo no hay presencia de inclinados alcalinos (rojo) y protuberancia acidas (amarillas), con o sin él concomitante oscurecimiento de la protuberancia debido a la producción del sulfuro de hidrogeno, la muestra cumple con la ausencia del genero *Salmonella*. (Solis N Pablo, Guerrero Solis. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)

11.7 Prueba para *Escherichia coli*.

1. Igual que la anterior con ayuda del asa tomar una porción del sobrante del medio fluido de Lactosa y rayar sobre la superficie de agar MacConkey.
2. Cubrir, invertir los platos e incubar.
3. Examinar la placa, si ninguna de las colonias concuerda con las características morfológicas presentada en la tabla cuatro (VER ANEXO) para este medio la muestra cumple con los requerimientos de la prueba para ausencia de *E.coli*.
4. Si se observan colonias que coincidan con las características morfológicas realizar con una identificación más detallada de la siguiente manera:
 - a. Transferir las colonias sospechosas individualmente por medio de un asa de inoculación, a la superficie de agar Levine Eosina – Azul de Metileno, solidificado en cajas Petri.
 - b. Si el número de colonias a transferir es alto dividir la superficie de cada placa en cuadrantes y sembrar las colonias por separado.
 - c. Cubrir, invertir los platos e incubar.
 - d. Al examinar si ninguna de las colonias exhibe un característico brillo metálico bajo la luz reflejada y una apariencia azul-negrucza bajo la luz transmitida, la muestra cumple con los requerimientos de la prueba para la ausencia de *E.coli*.
 - e. La presencia de *E.coli* puede ser confirmada mediante pruebas bioquímicas.(Solis N Pablo, Guerrero Solis. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)



11.8 Conteo total combinado de hongos y levaduras.

Proceder según se indica en el método de placas “Conteo microbiano total aeróbico”, excepto que en vez de utilizar el medio del digerido de soya caseína, utilizar el agar Sabouraud dextrosa o agar dextrosa papa y la incubación debe ser por 5-7 días a temperatura de 20-25°C (Solís N Pablo, Guerrero Solis. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)

11.9 Repetición del análisis.

Con el propósito de confirmar un resultado dudoso obtenido por medio de cualquier de los procedimientos descritos, mediante una muestra de 10.0g, una repetición con 25g de la misma. Pero haga ajustes debido a que la muestra es de mayor tamaño. (Solís N Pablo, Guerrero de Solís. Nilka, Gattusso Sussana, Cáceres Armando)



12. Resultados

Al realizar el Limite Microbiano bajo las condiciones necesarias a cada una de las muestras se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestra 1

Jarabe de Carao

“CARAO VID”, Frasco de 60 ml, Lote 109567

Tipo de análisis: Limite Microbiano	Especificaciones de la Farmacopea 36 NF 31	Especificaciones de la RTCA 11.03.56:09	Resultados del ensayo
Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM)	$\leq 10^2$ UFC	$\leq 10^4$ UFC	2 UFC/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Recuento de Hongos y Levaduras	≤ 10 UFC	$\leq 10^2$ UFC	3 UFC/ml

La presencia de Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM) fue de 2 UFC/ml.

Al utilizar los medios de cultivos selectivos para la detección de Bacterias patógenas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp*, la muestra no presento crecimiento de ellas.

Al finalizar el periodo de incubación de Hongos y Levaduras se obtuvieron 3 UFC/ml.



Muestra 2

Gotas Orales de Valeriana

“Valeriana”, Frasco 30 ml, Lote 16M14

Tipo de análisis: Limite Microbiano	Especificaciones de la Farmacopea 36 NF 31	Especificaciones de la RTCA 11.03.56:09	Resultados del ensayo
Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM)	$\leq 10^2$ UFC	$\leq 10^4$ UFC	Menos de 10 UFC/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Recuento de Hongos y Levaduras	≤ 10 UFC	$\leq 10^2$ UFC	Menos de 10 UFC/ml

La presencia de Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM) fue de menos de 10 UFC/ml.

Al utilizar los medios de cultivos selectivos para la detección de Bacterias patógenas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp*, la muestra no presento crecimiento de ellas.

Al finalizar el periodo de incubación de Hongos y Levaduras se obtuvieron menos de 10 UFC/ml



Muestra 3

Capsulas de Hierba de San Juan

“Hierba de san Juan St. John’s Wort” Frasco 40 capsulas de 500mg, Lote 423

Tipo de análisis: Limite Microbiano	Especificaciones de la Farmacopea 36 NF 31	Especificaciones de la RTCA 11.03.56:09	Resultados del ensayo
Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM)	$\leq 10^5$ UFC	$\leq 10^4$ UFC	70 UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausencia	Presencia
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Recuento de Hongos y Levaduras	$\leq 10^3$ UFC	$\leq 10^2$ UFC	8 UFC/g

La presencia de Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM) fue de 70 UFC/g.

Al utilizar los medios de cultivos selectivos para la detección de Bacterias patógenas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Salmonella spp*, la muestra no presento crecimiento de ellas.

Para la detección de *Escherichia coli* la muestra presento crecimiento de ella.

Al finalizar el periodo de incubación de Hongos y Levaduras se obtuvieron 8 UFC/g



Muestra 4

Pomada de Caléndula

“Pomada Dermaflor”, Tubo 30gr, Lote 30813005

Tipo de análisis: Limite Microbiano	Especificaciones de la Farmacopea 36 NF 31	Especificaciones de la RTCA 11.03.56:09	Resultados del ensayo
Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM)	$\leq 10^4$ UFC	$\leq 10^2$ UFC	Menos de 10 UFC/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Recuento de Hongos y Levaduras	$\leq 10^3$ UFC	$\leq 10^2$ UFC	Menos de 10 UFC/ml

La presencia de Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM) fue de menos de 10 UFC/ml.

Al utilizar los medios de cultivos selectivos para la detección de Bacterias patógenas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp*, la muestra no presento crecimiento de ellas.

Al finalizar el periodo de incubación de Hongos y Levaduras se obtuvieron menos de 10 UFC/ml



13. Validación para Ensayo de Limite Microbiano

13.1 Repetibilidad

<i>Staphylococcus aureus</i>			
Analista	D1	D2	D3
A1	1100	968	932
A2	1050	988	915
A3	1064	972	923

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

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	3	3186	1062	2404
Fila 2	3	3245	1081.66667	2033.333333
Fila 3	3	3286	1095.33333	650.3333333
Columna 1	3	3358	1119.33333	44.33333333
Columna 2	3	3215	1071.66667	158.3333333
Columna 3	3	3144	1048	1767
Promedio de los promedios			1079.66667	



Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analista	1684.666667	2	842.333333	1.494382022	0.32758139	6.94427191
Días	7920.666667	2	3960.33333	7.026020106	0.04909841	6.94427191
Repetibilidad	2254.666667	4	563.666667			
Total	11860	8				

(No hay diferencia significativa en los Analista, sin embargo en los días si. El factor Analista no afecta el promedio de los resultados, pero el factor día si afecta este promedio).

Evaluación de la precisión de Repetibilidad y Reproducibilidad interna del método.

Varianza entre días $S^2_d=$	$(MC_d-MC_r)/ni$	1132.222222
Varianza(operador) $s^2_{op}=$	$(MC_{op}-MC_r)/ni$	92.88888889
Precisión intermedia s_l	$(s^2_d+s^2_{op})^{1/2}$	35.00158727
Var Reproducibilidad $S^2_{PI}=$	$s^2_d+s^2_{op}+s^2_r$	1260.112698
Desviación Estándar de Reproducibilidad (s_{PI})=	$(s^2_d+s^2_{op}+s^2_r)^{1/2}$	58.98964128
RSD_R% o CV_R% =	$s_R * 100 / \text{prom total}$	5.463690146
Varianza de la media (s^2_{xm})=	$s^2_d+s^2_{op}+s^2_r/n$	596.2592593

$$s_r = \sqrt{CM_r} = 23.7416652$$

Var Repetibilidad (s^2_r)	
s_r	
RSD% o CV%, _r	2.19898103
Promedio Total	23.7416652

$$RSD\%_r = \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100$$

(El coeficiente de variación es menor al 20% por lo que si permite que haya Repetibilidad y reproducibilidad interna del método)



<i>Escherichia coli</i>			
Analista	D1	D2	D3
A1	1158	1038	1050
A2	1135	1042	1015
A3	1142	1020	1031

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	3246	1082	4368
Fila 2		3	3192	1064	3963
Fila 3		3	3193	1064.33333	4554.333333
Columna 1		3	3435	1145	139
Columna 2		3	3100	1033.33333	137.3333333
Columna 3		3	3096	1032	307
Promedio de los promedios			1070.11111		



Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analista	636.2222222	2	318.1111111	2.398826979	0.20672178	6.94427191
Días	25240.22222	2	12620.1111	95.16631755	0.00042367	6.94427191
Repetibilidad	530.4444444	4	132.611111			
Total	26406.88889	8				

(No hay diferencia significativa en los Analista, sin embargo en los días sí. El factor Analista no afecta el promedio de los resultados, pero el factor día si afecta este promedio).

Evaluación de la precisión de Repetibilidad y Reproducibilidad interna del método

Varianza entre días $S^2_d=$	$(MC_d-MC_r)/ni$	4162.5
Varianza(operador) $s^2_{op}=$	$(MC_{op}-MC_r)/ni$	61.83333333
Precisión intermedia s_I	$(s^2_d+s^2_{op})^{1/2}$	64.99487159
Var Reproducibilidad $s^2_{PI}=$	$s^2_d+s^2_{op}+s^2_r$	4289.328205
Desviación Estándar de Reproducibilidad $(s_{PI})=$	$(s^2_d+s^2_{op}+s^2_r)^{1/2}$	114.3277452
RSD _R % o CV _R % =	$s_R*100/prom\ total$	10.68372658
Varianza de la media $(s^2_{xm})=$	$s^2_d+s^2_{op}+s^2_r/n$	1452.314815

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

11.51568978

Var Repetibilidad (s^2_r)	
s_r	
RSD% _r o CV% _r	1.07612094
Promedio Total	11.51568978

$$RSD\%_r = \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100$$

(El coeficiente de variación es menor al 20% por lo que si permite que haya Repetibilidad y reproducibilidad interna del método)



<i>Pseudomona aeruginosa</i>			
Analista	D1	D2	D3
A1	1112	1060	1014
A2	1125	1085	1035
A3	1121	1070	1095

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

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	3	3186	1062	2404
Fila 2	3	3245	1081.66667	2033.333333
Fila 3	3	3286	1095.333333	650.3333333
Columna 1	3	3358	1119.333333	44.33333333
Columna 2	3	3215	1071.66667	158.3333333
Columna 3	3	3144	1048	1767
Promedio de los promedios			1079.66667	



Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analistas	1684.666667	2	842.333333	1.494382022	0.32758139	6.94427191
Días	7920.666667	2	3960.33333	7.026020106	0.04909841	6.94427191
Repetibilidad	2254.666667	4	563.666667			
Total	11860	8				

(No hay diferencia significativa en los Analista, sin embargo en los días si. El factor Analista no afecta el promedio de los resultados, pero el factor día si afecta este promedio).

Evaluación de la precisión de Repetibilidad y Reproducibilidad interna del método

Varianza entre días $S^2_d=$	$(MC_d-MC_r)/ni$	1132.222222
Varianza(operador) $s^2_{op}=$	$(MC_{op}-MC_r)/ni$	92.88888889
Precisión intermedia s_I	$(s^2_d+s^2_{op})^{1/2}$	35.00158727
Var Reproducibilidad $s^2_{PI}=$	$s^2_d+s^2_{op}+s^2_r$	1260.112698
Desviación Estándar de Reproducibilidad $(s_{PI})=$	$(s^2_d+s^2_{op}+s^2_r)^{1/2}$	58.98964128
RSD _R % o CV _R % =	$s_R*100/prom\ total$	5.463690146
Varianza de la media $(s^2_{xm})=$	$s^2_d+s^2_{op}+s^2_r/n$	596.2592593

$$s_r = \sqrt{CM_r} = 23.7416652$$

Var Repetibilidad (s^2_r)	
s_r	
RSD% _r o CV% _{0,r}	2.19898103
Promedio Total	23.7416652

$$RSD\%_r = \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100$$

(El coeficiente de variación es menor al 20% por lo que si permite que haya Repetibilidad y reproducibilidad interna del método)



<i>Salmonella spp</i>			
Analista	D1	D2	D3
A1	948	926	1142
A2	875	984	998
A3	901	895	1003

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	3016	1005.333333	14129.33333
Fila 2	3	2857	952.333333	4534.33333
Fila 3	3	2799	933	3684
Columna 1	3	2724	908	1369
Columna 2	3	2805	935	2041
Columna 3	3	3143	1047.666667	6680.33333
Promedio de los promedios			963.555556	



Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analista	8414.888889	2	4207.444444	1.430400786	0.33991495	6.94427191
Días	32929.55556	2	16464.77778	5.597514449	0.0692974	6.94427191
Repetibilidad	11765.77778	4	2941.444444			
Total	53110.22222	8				

(No hay diferencia significativa en los Analista, ni en los días. Por lo que los factores Analistas y Dias no afectan el promedio de los resultados).

Evaluación de la precisión de Repetibilidad y Reproducibilidad interna del método

Varianza entre días $S^2_{d=}$	$(MC_d - MC_r)/ni$	4507.777778
Varianza(operador) $s^2_{op=}$	$(MC_{op} - MC_r)/ni$	422
Precisión intermedia s_I	$(s^2_d + s^2_{op})^{1/2}$	70.21237624
Var Reproducibilidad $S^2_{PI=}$	$s^2_d + s^2_{op} + s^2_r$	4999.990154
Desviación Estándar de Reproducibilidad (s_{PI})=	$(s^2_d + s^2_{op} + s^2_r)^{1/2}$	127.5678469
$RSD_R\%$ o $CV_R\%$ =	$s_R * 100 / \text{prom total}$	13.239283
Varianza de la media $(s^2_{xm})=$	$s^2_d + s^2_{op} + s^2_r / n$	2623.740741

$$s_r = \sqrt{CM_r} = 54.235085$$

Var Repetibilidad (s^2_r)	
s_r	
$RSD\%_r$ o $CV\%_r$	5.628641201
Promedio Total	54.235085

$$RSD\%_r = \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100$$

(El coeficiente de variación es menor al 20% por lo que si permite que haya Repetibilidad y reproducibilidad interna del método)



Hongos y Levaduras			
Analista	D1	D2	D3
A1	712	702	840
A2	718	705	795
A3	724	820	781

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

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	3	2254	751.3333333	5921.333333
Fila 2	3	2218	739.3333333	2366.333333
Fila 3	3	2325	775	2331
Columna 1	3	2154	718	36
Columna 2	3	2227	742.3333333	4526.333333
Columna 3	3	2416	805.3333333	950.3333333
Promedio de los promedios			755.222222	



Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analista	1976.222222	2	988.1111111	0.436777093	0.6736408	6.94427191
Días	12188.22222	2	6094.111111	2.693794357	0.18155653	6.94427191
Repetibilidad	9049.111111	4	2262.277778			
Total	23213.55556	8				

(No hay diferencia significativa en los Analista, ni en los días. Por lo que los factores Analista y Días no afectan el promedio de los resultados).

Evaluación de la precisión de Repetibilidad y Reproducibilidad interna del método

Varianza entre días $S^2_{d=}$	$(MC_d - MC_r)/ni$	1277.277778
Varianza(operador) $s^2_{op=}$	$(MC_{op} - MC_r)/ni$	-424.722222
Precisión intermedia s_I	$(s^2_d + s^2_{op})^{1/2}$	29.198554
Var Reproducibilidad $S^2_{PI=}$	$s^2_d + s^2_{op} + s^2_r$	881.7541096
Desviación Estándar de Reproducibilidad (s_{PI})=	$(s^2_d + s^2_{op} + s^2_r)^{1/2}$	99.50711867
RSD _R % o CV _R % =	$s_R * 100 / \text{prom total}$	13.17587271
Varianza de la media $(s^2_{xm})=$	$s^2_d + s^2_{op} + s^2_r/n$	1038.277778

$$s_r = \sqrt{CM_r} = 47.56340797$$

Var Repetibilidad (s^2_r)	
s_r	
RSD% _r o CV% _r	6.297935438
Promedio Total	47.5340797

$$RSD\%_r = \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100$$

(El coeficiente de variación es menor al 20% por lo que si permite que haya Repetibilidad y reproducibilidad interna del método)



13.2 Exactitud

Muestra de Jarabe de Carao

1000 UFC

	Medio + <u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	Medio + <u><i>Pseudomona aeruginosa</i></u>	Medio + <u><i>Escherichia coli</i></u>	Medio + <u><i>Salmonella spp</i></u>	Medio + Hongos y Levaduras
A1	854	886	769	818	876
A2	869	893	988	836	997
A3	888	856	866	842	1000
Promedio	870.333333	878.333333	874.333333	832	957.666667
	Muestra Estéril+ <u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	Muestra Estéril + <u><i>Pseudomona aeruginosa</i></u>	Muestra Estéril + <u><i>Escherichia coli</i></u>	Muestra Estéril + <u><i>Salmonella spp</i></u>	Muestra Estéril + Hongos y Levaduras
A1	785	801	760	744	787
A2	790	824	790	780	798
A3	796	833	819	795	834
Promedio	790.333333	819.333333	789.666667	773	806.333333



RESUMEN	A1	A2	A3	S	X PROMEDIO	EXACTITUD	PRECISIÓN VC%
<u>Staphylococcus aureus</u>	91.9203747	90.9090909	89.6396396	1.14280021	90.8230351	85.9779793	1.25827133
<u>Pseudomona aeruginosa</u>	90.4063205	92.2732363	97.3130841	3.57278658	93.3308803	93.2827324	3.82808623
<u>Escherichia coli</u>	98.8296489	79.9595142	94.5727483	9.89738853	91.1206371	90.3164316	10.8618518
<u>Salmonella spp</u>	90.9535452	93.3014354	94.4180523	1.7683434	92.891011	92.9086538	1.90367549
Hongos y Levaduras	89.8401826	80.0401204	83.4	4.98005965	84.4267677	84.1977027	5.89867383

(El porcentaje de recuperación para la muestra de Jarabe de Carao es mayor del 70% para bacterias patógenas, hongos y levaduras.

El coeficiente de variación es inferior al 20% para bacterias patógenas, hongos y levaduras por lo tanto no cuestiona nuestro sistema de trabajo.)



Gotas Orales de Valeriana

	Medio + <u>Staphylococcus aureus</u>	Medio + <u>Pseudomona aeruginosa</u>	Medio + <u>Escherichia coli</u>	Medio + <u>Salmonella spp</u>	Medio + Hongos y Levaduras
A1	911	909	897	906	889
A2	918	898	908	894	895
A3	927	927	919	926	906
Promedio	918.666667	911.333333	908	908.666667	896.666667
	Muestra Estéril+ <u>Staphylococcus aureus</u>	Muestra Estéril + <u>Pseudomona aeruginosa</u>	Muestra Estéril + <u>Escherichia coli</u>	Muestra Estéril + <u>Salmonella spp</u>	Muestra Estéril + Hongos y Levaduras
A1	815	801	809	797	808
A2	828	817	816	814	817
A3	839	830	825	821	828
Promedio	827.333333	816	816.666667	810.666667	817.666667



RESUMEN	A1	A2	A3	S	X PROMEDIO	EXACTITUD	PRECISIÓN VC%
<u>Staphylococcus aureus</u>	89.4621295	90.1960784	90.5070119	0.53652271	90.05507328	90.0580552	0.595771774
<u>Pseudomona aeruginosa</u>	88.1188119	90.9799555	89.5361381	1.43059223	89.54496847	89.5391368	1.597624358
<u>Escherichia coli</u>	90.1895206	89.8678414	89.7714908	0.21890254	89.94295093	89.9412628	0.243379321
<u>Salmonella spp</u>	87.9690949	91.0514541	88.6609071	1.61731555	89.22715206	89.214967	1.81258228
Hongos y Levaduras	90.8886389	91.2849162	91.3907285	0.26467774	91.18809453	91.1895911	0.290254713

(El porcentaje de recuperación para la muestra de Gotas Orales de Valeriana es mayor del 70% para bacterias patógenas, hongos y levaduras.

El coeficiente de variación es inferior al 20% para bacterias patógenas, hongos y levaduras por lo tanto no cuestiona nuestro sistema de trabajo.)



Capsulas de Hierba de San Juan

	Medio + <u>Staphylococcus aureus</u>	Medio + <u>Pseudomona aeruginosa</u>	Medio + <u>Escherichia coli</u>	Medio + <u>Salmonella spp</u>	Medio + Hongos y Levaduras
A1	817	416	817	811	903
A2	829	430	826	818	920
A3	837	466	838	827	950
Promedio	827.666667	437.333333	827	818.666667	924.333333
	Muestra Estéril+ <u>Staphylococcus aureus</u>	Muestra Estéril + <u>Pseudomona aeruginosa</u>	Muestra Estéril + <u>Escherichia coli</u>	Muestra Estéril + <u>Salmonella spp</u>	Muestra Estéril + Hongos y Levaduras
A1	786	370	789	800	805
A2	799	385	797	817	817
A3	813	392	811	826	822
Promedio	799.333333	382.333333	799	814.333333	814.666667



RESUMEN	A1	A2	A3	S	X PROMEDIO	EXACTITUD	PRECISIÓN VC%
<u>Staphylococcus aureus</u>	96.2056304	96.3811821	97.1326165	0.49240486	96.573143	96.5767217	0.50987764
<u>Pseudomona aeruginosa</u>	98.873592	99.3834772	99.5115995	0.33750354	99.2562229	99.2589543	0.34003263
<u>Escherichia coli</u>	96.5728274	96.4891041	96.778043	0.14866554	96.6133248	96.6142684	0.15387685
<u>Salmonella spp</u>	87.2437358	87.6404494	88.6956522	0.75043274	87.8720238	99.5881384	0.85400644
Hongos y Levaduras	89.1472868	88.8043478	86.5263158	1.4245775	88.1593168	88.1355932	1.61591259

(El porcentaje de recuperación para la muestra de Hierba de San Juan es mayor del 70% para bacterias patógenas, hongos y levaduras.

El coeficiente de variación es inferior al 20% para bacterias patógenas, hongos y levaduras por lo tanto no cuestiona nuestro sistema de trabajo.)



Pomada de Caléndula

	Medio + <u>Staphylococcus aureus</u>	Medio + <u>Pseudomona aeruginosa</u>	Medio + <u>Escherichia coli</u>	Medio + <u>Salmonella spp</u>	Medio + Hongos y Levaduras
A1	996	408	782	785	799
A2	812	419	890	803	816
A3	825	426	903	818	830
Promedio	877.666667	417.666667	858.333333	802	815
	Muestra Estéril+ <u>Staphylococcus aureus</u>	Muestra Estéril + <u>Pseudomona aeruginosa</u>	Muestra Estéril + <u>Escherichia coli</u>	Muestra Estéril + <u>Salmonella spp</u>	Muestra Estéril + Hongos y Levaduras
A1	798	377	780	780	780
A2	809	384	797	788	790
A3	820	395	810	796	805
Promedio	809	385.333333	795.666667	788	791.666667



RESUMEN	A1	A2	A3	S	X PROMEDIO	EXACTITUD	PRECISIÓN VC%
<u>Staphylococcus aureus</u>	80.1204819	99.6305419	99.3939394	11.1964621	93.0483211	92.1762248	12.0329545
<u>Pseudomona aeruginosa</u>	95.9657702	96.0048426	97.1257485	0.65872432	96.3654538	96.3695038	0.68356895
<u>Escherichia coli</u>	99.7442455	89.5505618	89.7009967	5.84238345	92.9986013	92.6990291	6.28222722
<u>Salmonella spp</u>	99.3630573	98.132005	97.3105134	1.03305974	98.2685253	98.2543641	1.05126208
Hongos y Levaduras	97.6220275	96.8137255	96.9879518	0.42539375	97.1412349	97.1370143	0.43791264

(El porcentaje de recuperación para la muestra de Pomada de Caléndula es mayor del 70% para bacterias patógenas, hongos y levaduras.

El coeficiente de variación es inferior al 20% para bacterias patógenas, hongos y levaduras por lo tanto no cuestiona nuestro sistema de trabajo.)



14. Análisis de Resultados

Para la determinación de microorganismos en productos naturales no estériles en las muestras de Gotas Orales de Valeriana y Pomada de Caléndula:

1. No hubo presencia de Bacterias Aerobias Mesófilas.
2. Para el caso de Bacterias patógenas tales como: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp*, las muestras presentan ausencia de crecimiento de estos microorganismos.
3. Para estas muestras no se encontró crecimiento de hongos y levaduras.

Por lo tanto las muestras de Gotas Orales de Valeriana y la Pomada de Caléndula analizadas cumple con las especificaciones de la Farmacopea 36 NF 31 y el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 11.03.56:09) para productos naturales no estériles de administración oral y tópica.

En la muestra de Jarabe de Carao se encontró:

1. Presencia de Bacterias Aerobias Mesófilas (2UFC).
2. La muestra no presento crecimiento de Bacterias Patógenas (*Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp*).
3. El Jarabe presento crecimiento de Hongos y Levaduras (3UFC).

Al finalizar el estudio en la muestra de Capsulas de Hierba de San Juan se obtuvieron:

1. Presencia de Bacterias Aerobias Mesófilas (70UFC).
2. La muestra no presento crecimiento de Bacterias Patógenas (*Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp*), pero si *Escherichia coli*
3. Las capsulas presentaron crecimiento de Hongos y Levaduras (8UFC).

Por lo tanto la muestra analizada de Jarabe de Carao a pesar que presentan crecimiento de Bacterias Aerobias y Mesófilas, Hongos y Levaduras, cumplen con las especificaciones de limite microbiano de la farmacopea 36 NF 31 y el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 11.03.56:09) para productos naturales no estériles de administración oral por estar en el rango de especificaciones y porque no presenta Bacterias Patógenas, en cambio la muestra de Capsulas de Hierba de San Juan a pesar que presento crecimiento de Bacterias



Aerobias y Mesófilas; Hongos y Levaduras que están en el rango de las especificaciones de la farmacopea 36 NF 31 y el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 11.03.56:09) no cumple con las especificaciones de ausencia para bacterias patógenas presentando *Escherichia coli*.



15. Conclusión

En base a los resultados obtenidos, las muestras analizadas (Jarabe de Carao, Gotas Orales de Valeriana y Pomada de Caléndula) cumplen con las especificaciones de la Farmacopea 36 NF 31 y el Reglamento Técnico Centroamericano 11.03.59:09 por estar en el rango de Bacterias Aerobias Mesófilas y Hongos y levaduras que no afectan la salud de la población.

La muestra de Capsulas de Hierba de San Juan cumple con las especificaciones para Bacterias Aerobias Mesófilas y Hongos y levaduras por estar en el rango establecido, pero no con la ausencia de patógenos por presentar *Escherichia coli*, patógeno que afecta el estado de salud de la población.

Los fitofármacos (Jarabe de Carao, Gotas Orales de Valeriana y Pomada de Caléndula) son de uso seguro para la población los cuales ayudaran en el tratamiento de las enfermedades de la población. Las capsulas de Hierba de San Juan no son un fitofármaco que posea una excelente calidad microbiológica por contener un patógeno genuinamente fecal (*Escherichia coli*)

Por lo tanto podemos afirmar que no todos los fitofármacos expendidos en los Centros Botánicos de la Ciudad de León garantizan la calidad microbiológica necesaria para ser consumidos por la población.

Los resultados obtenidos mediante la elaboración de esta investigación garantizan su veracidad debido a que el método aplicado (Limite Microbiano) fue previamente validado, por lo tanto los datos plasmados son seguros y confiables.



16.Recomendaciones

- ❖ Llevar acabo ensayos de Limite Microbiano a distintos fitofármacos, que en su etiqueta no presente registro sanitario, para comprobar su calidad microbiológica, ya que es posible que se encuentren resultados positivos que pueden poner en riesgo la salud de la población .
- ❖ Que el Ministerio de Salud aplique la ley para productos fitosanitarios y exigir el registro sanitario a cada fitofármaco, antes de que la población tenga acceso a ellos en los diferentes Centros Botánicas.
- ❖ Brindar a los estudiantes de la Carrera de Farmacia las competencias necesarias sobre la importancia de la calidad microbiológica que deben tener los fitofármacos para ser comercializados y así lograr que la población consuma productos seguros, eficaces y confiables.



17. Bibliografía

1. Sharapin Nikolai. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Primera edición. Pág. 15, 16,17, 27-28, 143-147.
2. A.Raman, Calidad de las plantas medicinales. Revista Industria Farmacéutica N° 93 May/Jun 2001, Paginas 117-119.
3. Arguello G. Nadia. Martínez U. Yessenia. 2004 “Análisis microbiológico de fitofármacos no obligatoriamente estériles elaborados por el laboratorio Ecolife” UNAN-León, Facultad de Ciencias Químicas, León-Nicaragua.
4. Andino Medina Allam Noé, Espinoza Lira Walter Manuel, Lagos Vásquez Ariel Antonio. 2007 “Determinación del límite microbiológico al jugo de *Morinda citrifolia* L. (Noni) con mayor demanda en farmacias y/o centros naturistas de la ciudad de león”. Páginas: 27,29.
5. Arbizu Ramírez Yessenia, Berrios Romero María José. 2008 “Estudio microbiológico en jarabe de carao (*Cassia grandis* L.) con mayor demanda a nivel ambulatorio en la ciudad de león. Páginas: 23,25.
6. A. Forbes. Betty. Diagnostico Microbiológico. 2007. Ed. Medica Panamericana.S, A. Pag. 98. Disponible en internet:
http://books.google.com.ni/books?id=239cauKqSt0C&pg=PR4&lp=PR4&dq=A.+Forbes.+Betty.+Diagnostico+Microbiol%C3%B3gico.+2007&source=bl&ots=2PbwIgaINf&sig=jh11aEmlUdbraFJqVzg6_CZ1AZ4&hl=es&sa=X&ei=C3iOU8naFpGGogTOILABA&ved=0CCgQ6AEwAQ#v=onepage&q=A.%20Forbes.%20Betty.%20Diagnostico%20Microbiol%C3%B3gico.%202007&f=false
7. Bolaños López, Lidia del Carmen, Bolaños López, Junieth Esperanza, López Peralta, Byron Efraín. Determinación del límite microbiano del jarabe de carao (*Cassia grandis* L.) con mayor demanda por la población comercializado en centros naturistas de la ciudad de León. 2013 páginas: 21, 23.



8. Coello Brito, Rómulo Javier. 2012. “Elaboración y control de calidad de gel cicatrizante a base de sábila (*Aloe vera*) y Caléndula (*Caléndula Officinalis*)”. Página: 94. Disponible en internet como archivo pdf en: http://www.google.com.ni/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CBoQFjAA&url=http%3A%2F%2Fspace.esPOCH.edu.ec%2Fbits_tream%2F123456789%2F1997%2F1%2F56T00305.pdf&ei=zI2tU5HsEPTMsQTOooGwAQ&usg=AFQjCNEfTsbJqMzKMOd7_Htv7vgp8Fe7XQ&sig2=TjJyhvtZCYVGwLN5ZdKvZA&bvm=bv.69837884,d.b2U
9. C.G.Maria Concepción; T .C. Gertrudis; M. A. María. Medios de Cultivo en Laboratorio de Microbiología (2012). Disponible en internet: <http://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>. Revisado 31 de mayo 2014.
10. Contreras Rivera, Jenifer Patricia, “Propuesta de dos formulaciones a partir de *Valeriana prionophylla* Stadl. como sedante y ansiolítico. (online). 2009 citado (22-05-14). Páginas: 32, 38, 42,43. Disponible como archivo pdf en: http://www.google.com.ni/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CCsQFjAA&url=http%3A%2F%2Fbiblioteca.usac.edu.gt%2Ftesis%2F06%2F06_2970.pdf&ei=u7F-U-uHBOmxsATd_ICgCw&usg=AFQjCNEOoTLUv5F0Y5OsDdgTVn6q5iFThg&sig2=mjxVpVayQTSjoPIF_a9PaQ&bvm=bv.67720277,d.cWc
11. Diccionario de la Real Academia Española. (RAE). (2001). Disponibles en internet: <http://lema.rae.es/drae/?val=aflatoxina>. Revisado 28 de mayo 2014.
12. Fonnegra G. Ramiro; Jiménez R. Silvia Luz. (2007). Plantas Medicinales aprobadas en Colombia. 2da Edición, Pág. 72, 75. Disponible en Internet: <http://books.google.com.ni/books?id=K8eI->



7ZeFpsC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false. Revisado el 25 de Junio del 2014.

13. GUTIERREZ GAITEN, Yamilet Irene et al. Suspensión oral antidiarreica de Psidium guajaba, L. *Rev Cubana Farm* [online]. 2000, vol.34, n.1 [citado 2014-01-24], pp. 44-49. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475152000000100006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1561-2988.
14. García del Valle Araceli; Zamudio Duran Ma. de las Mercedes. (1998). Manual Microbiología de México. Pag 223. Disponible en internet: <http://books.google.com.ni/books?id=b3FKwKELz4YC&pg=PA223&dq=vogel+johnson&hl=es&sa=X&ei=LGLU8zRBNHxoATQw4CgCw&ved=0CCoQ6AEwA#v=onepage&q=vogel%20johnson&f=false>. Revisado el 01 de Junio 2014.
15. Ingraham Jhon L, Ingraham Catherine A. Introducción a la microbiología. Editorial Reverte, S.A., 1998. Páginas: 559-561. Disponible en internet en: <http://books.google.com.ni/books?id=dUEZSXaz2UC&pg=PA559&dq=salmonella+microbiologia&hl=es419&sa=X&ei=xEMUU4eAHsXPkQeP5IDIBA&ved=0CC8Q6AEwAQ#v=onepage&q=salmonella%20microbiologia&f=false>. Revisado el 27 de Abril 2014.
16. J.M.Mateo Box. Prontuario de Agricultura (2005). Ed. Mundi-Prensa. Página 582 Disponible en internet: <http://books.google.com.ni/books?id=Glts8S4zuWAC&pg=PA582&dq=cucumis+sativus+propiedades&hl=es&sa=X&ei=pb9dU7qWJbOqsQSR04DgDg&ved=0CFMQ6AEwBw#v=onepage&q=cucumis%20sativus%20propiedades&f=false>. Revisado 27 de abril 2014.
17. L. Cid Elena; G. Cortes Francisco; M. Miguel; P. Pedro; M. Ledesma M^a Concepción; B. Ureña Jesús; a. Villalba Joaquín; L. Cid Teresa. (2011). Diccionario



médico-biológico histórico y etimológico. Disponible en Internet: <http://dicciomed.eusal.es/>. Revisado el 03 de Junio 2014.

18. LAGARTO PARRA, Alicia y GUERRA SARDINAS, María Isabel. Toxicidad aguda oral de 3 formas farmacéuticas a partir de *Cassia grandis* L. *Rev Cubana Plant Med* [online]. 2000, vol.5, n.2 [citado 2014-04-29], pp. 68-70 . Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962000000200009&lng=es&nrm=iso. ISSN 1028-4796. Revisado 03 de Junio 2014.
19. Martin Frobisher et. Al. Microbiología Frobiser 5ta edición 1978 Salvat Editores S.A. páginas: 162-172, 473-475, 507-512, 560-563. Revisado 03 de Junio 2014.
20. MENENDEZ CASTILLO, Rosa. Acerca de las buenas prácticas de manufactura de fitofármacos. *Rev Cubana Plant Med* [online]. 2001, vol.6, n.2 [citado 2014-02-25], pp. 43-43 . Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962001000200001&lng=es&nrm=iso. ISSN 1028-4796. Revisado el 03 de Junio 2014.
21. MacFaddin. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia clínica. 3ªed. Ed. Medica Panamericana. Pag 612. Disponible en internet: <http://books.google.com.ni/books?id=FYWSzy7EjR0C&pg=PA287&dq=lisostafina&hl=es&sa=X&ei=N7aLU5viFImpsASRi4GgDw&ved=0CDEQ6AEwAQ#v=onepage&q=lisostafina&f=false>. Revisado el 31 de Mayo 2014.
22. Marcano Deanna y Hasegawa Masahina. (2002). 2ª ed. Ed. Torino. Pag 384).Disponible en Internet: <http://books.google.com.ni/books?id=hPkjgPwXD-QC&pg=PA384&dq=reactivo+de+dragendorff&hl=es&sa=X&ei=6LWLU-H-LI-lsATC3YDYDA&ved=0CDEQ6AEwAQ#v=onepage&q=reactivo%20de%20drage ndorff&f=false> .Revisado 30 de mayo 2014.



23. Muñoz Orlando; Montes Marco; Wilkomirsky Tatiana. (2004). Plantas medicinales de uso en Chile. 2da Edición. Ed Universitaria. Chile. Pag 149, 151. Disponible en internet:
http://books.google.com.ni/books?id=cuviT1SKao8C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false. Revisado el 25 de Junio 2014.
24. P.P Manuel de la Rosa José. (1997). Microbiología en ciencia de la Salud. Concepto y Aplicaciones. Primera Edición. Editorial EDIDE.S,L. Pág. 15 Disponible en internet en:
<http://books.google.com.ni/books?id=ZttS4I6wCpYC&pg=PT40&dq=aerobias+mesofilas&hl=es&sa=X&ei=g3oWU9vIDMH8kQeHhYGoAw&ved=0CEUQ6AEwBg#v=onepage&q=aerobias%20mesofilas&f=false>. Revisado el 04 de Marzo del 2014.
25. Pascual A. María del Rosario. 2000. Microbiología alimentaria: Metodología analítica y bebidas. 2da edición. Madrid. Editorial Díaz de Santos S.A. Pagina: 142. Disponible en internet en:
<http://books.google.com.ni/books?id=9EIfkks8uxMC&printsec=frontcover&vq=hongos+y+levaduras#v=onepage&q=hongos%20y%20levaduras&f=false>. Revisado 04 de Marzo 2014.
26. Roldan A. Alfredo (2004). 100 Plantas Medicinales Escogidas. 4ta edición. Editorial EDAF. S.A Pág. 105, 106,107. España. Disponible en internet: Revisado el 25 de Junio del 2014.
27. Ramiro Fonnegra G, Fonnegra Gómez Fonnegra G., Jiménez Ramírez Jiménez R.(2007). Plantas Medicinales aprobadas en Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. Página 257. Disponible en internet:
<http://books.google.com.ni/books?id=K8eI7ZeFpsC&printsec=frontcover&dq=nom>



bre+cientifico+de+la+valeriana+libros&hl=es&sa=X&ei=FFRZU7iUFcru2AXjzoCwDw&ved=0CCsQ6AEwAA. Revisado 24 de abril 2014.

28. Rodríguez Rivas, Migdalia, López Guerra, Regla Lisbel, Casas Blanco, José Carlos. (2002) “Fitofármacos en la atención primaria de salud: disponibilidad y uso” Disponible en internet : <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6546>. Revisado el 24 de Abril 2014.
29. Reglamento técnico centroamericano NSO RTCA 11.01.35:06 “Productos farmacéuticos. Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos” página 5. Revisado el 24 de Abril 2014.
30. Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 11.03.56:09 “Productos Farmacéuticos. Productos Naturales Medicinales para uso Humano”. Revisado el 24 de Abril 2014.
31. RUIZ SALVADOR, Ana Karelia; GARCIA MILIAN, Ana Julia; NELLAR NELLAR, Caridad y CARRAZANA LEE, Armando. Consumo de fitofármacos y apifármacos en el Hospital Docente Clinicoquirúrgico “Gral. Calixto García Íñiguez”. *Rev Cubana Plant Med* [online]. 2005, vol.10, n.2 [citado 2014-02-03], pp. 0-0 . Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962005000200013&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1028-4796. Revisado el 24 de Abril 2014.
32. Sharapin Nikolai. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapeúticos. Primera edición. Pág. 15, 16,17, 27-28, 143-147. Revisado el 24 de Abril 2014.
33. Sosa Gómez R. (1998). El Poder medicinal de las plantas. Páginas 358-359. Revisado 27 de Abril 2014.

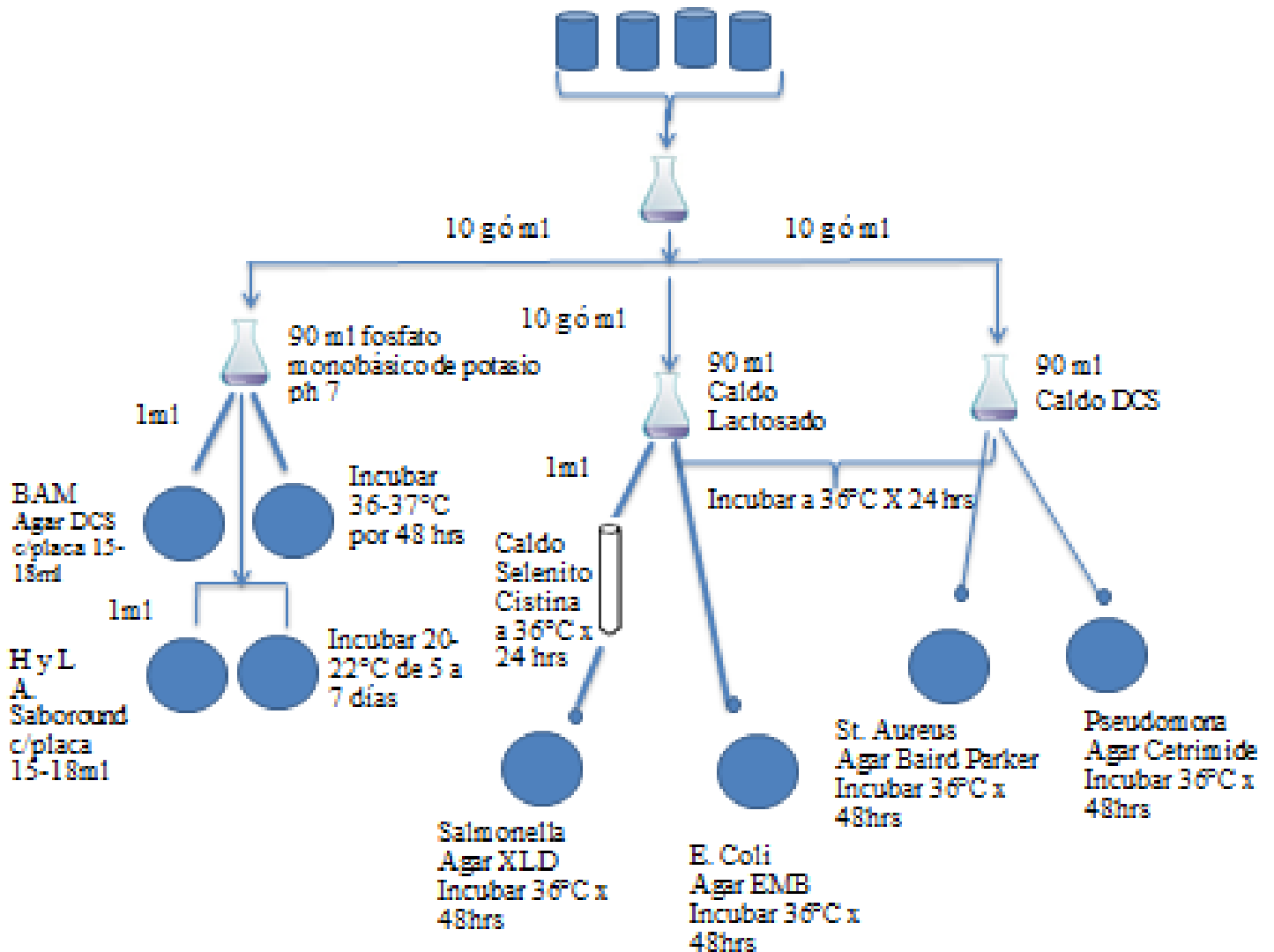


34. Solís N Pablo, Guerrero de Solis. Nilka, Gattusso Sussana, Caceres Armando. Manual de caracterización y análisis de drogas vegetales y productos fitoterapeúticos. Organización de los estados unidos americanos, paginas 84-93. Revisado el 27 de Abril 2014.
35. USP 30, NF25, Volumen 1. Farmacopea de los estados unidos de América. 2007. Páginas: 85-87, 91-96, 785. Revisado el 27 de Abril 2014.
36. Winn(h); Allen; Jande; Komenan; Procop; Schreckenberger; Woods. 2008. Diagnostico Microbiológico. 6ª ed. Ed. Medica Panamericana. S,A. Pag 340, 1006). Disponible en internet: http://books.google.com.ni/books?id=jyVQueKro88C&printsec=frontcover&dq=diagnostico+microbiol%C3%B3gico+koneman&hl=es&sa=X&ei=ZnOOU5DkHo_6oASJs4LoBQ&redir_esc=y#v=onepage&q=diagnostico%20microbiol%C3%B3gico%20koneman&f=false. Revisado 01 de junio 2014.
37. USP 36, NF 31. Volumen 1. 2013. Farmacopea delos Estados Unidos de América. Artículo <2023> Atributos microbiológicos no estéril, nutricional y suplementos dietéticos. Disponible en internet: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_admissions-7-59.html. Revisado el 13 de Octubre 2014.



18. ANEXOS.

18.1 Ensayo de Limite Microbiano





**18.2 Imágenes de Resultado de Límite Microbiano
Bacterias Aerobias Mesófilas (Agar DCS)**

Jarabe de Carao



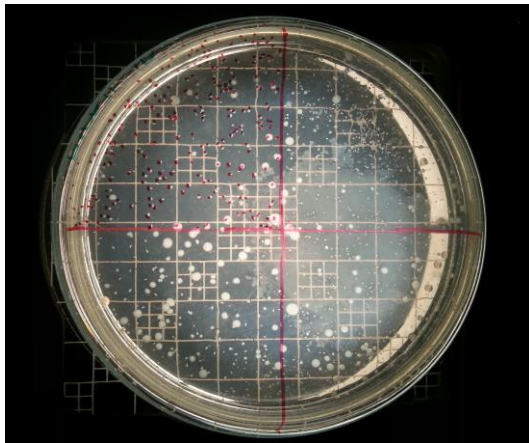
2 UFC

Gotas Orales de Valeriana



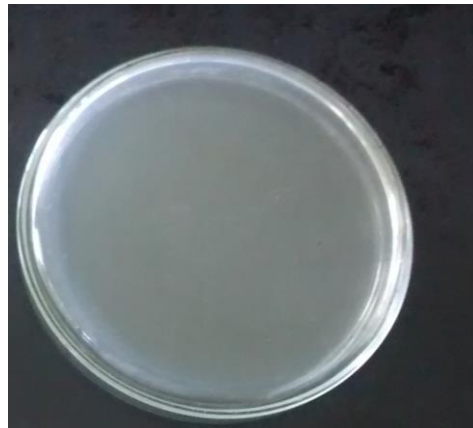
0 UFC

Capsulas de Hierba de San Juan



70 UFC

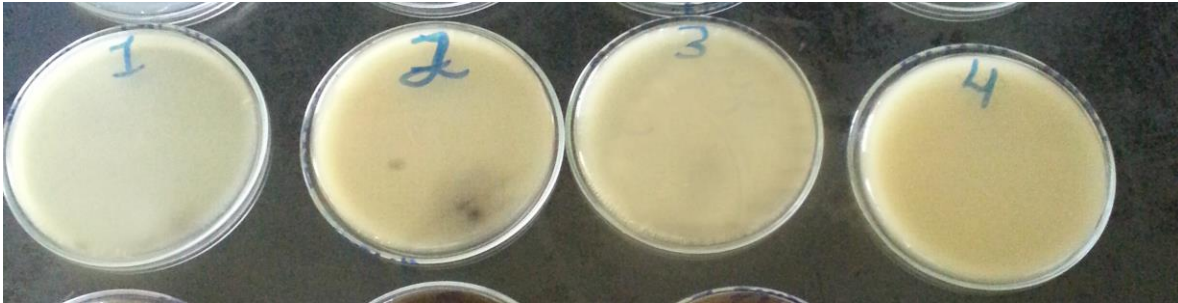
Pomada de Caléndula



0 UFC



Staphylococcus aureus (Agar Baird Parker)



Muestra 1: Jarabe de Carao	(Ausencia)
Muestra 2: Gotas Orales de Valeriana	(Ausencia)
Muestra 3: Capsulas de Hierba de San Juan	(Ausencia)
Muestra 4: Pomada de Caléndula	(Ausencia)

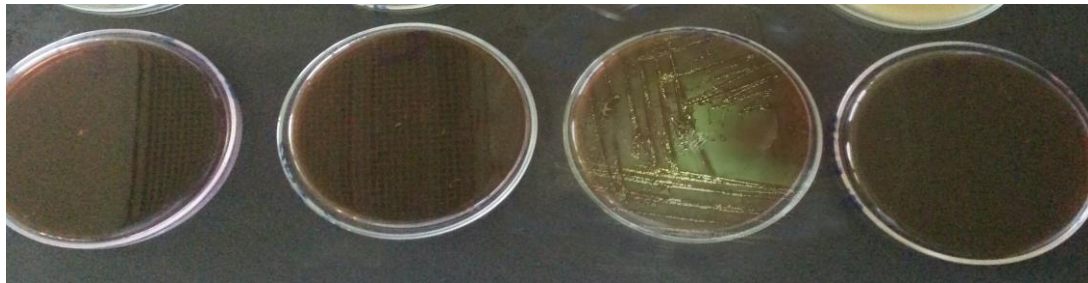
Pseudomona aeruginosa (Cetrimide)



Muestra 1: Jarabe de Carao	(Ausencia)
Muestra 2: Gotas Orales de Valeriana	(Ausencia)
Muestra 3: Capsulas de Hierba de San Juan	(Ausencia)
Muestra 4: Pomada de Caléndula	(Ausencia)



Escherichia coli (Agar EMB)



1

2

3

4

Muestra 1: Jarabe de Carao	(Ausencia)
Muestra 2: Gotas Orales de Valeriana	(Ausencia)
Muestra 3: Capsulas de Hierba de San Juan	(Presencia)
Muestra 4: Pomada de Caléndula	(Ausencia)

Salmonella spp (Agar XLD)



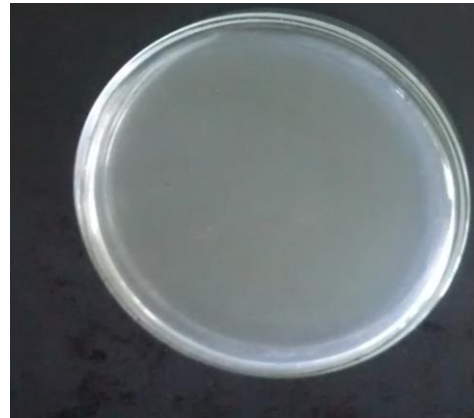
Muestra 1: Jarabe de Carao	(Ausencia)
Muestra 2: Gotas Orales de Valeriana	(Ausencia)
Muestra 3: Capsulas de Hierba de San Juan	(Ausencia)
Muestra 4: Pomada de Caléndula	(Ausencia)



Hongos y Levaduras (Agar Saboround)



3 UFC
Jarabe de Carao



0 UFC
Gotas Orales de Valeriana



8 UFC
Capsulas de Hierba de San Juan



0 UFC
Pomada de Calendula



18.3 Muestras

Jarabe de Carao



Gotas Orales de Valeriana



Capsulas de Hierba de San Juan



Pomada de Caléndula





18.4 Entrevista.

La presente fue llevada a cabo con el objetivo de determinar cuáles son los fitomedicamentos más comercializados a la población en sus diferentes presentaciones en los centros naturistas de la ciudad de León, en el mes de Marzo 20014.

- ❖ ¿Cuál es el jarabe más vendido?

- ❖ ¿Cuáles son las capsulas más vendidas?

- ❖ ¿Cuál es la crema o pomada más vendida?

- ❖ ¿Cuáles son las gotas orales más vendidas?



19 Tablas

Tabla 1. Características Morfológicas Del Staphylococcus Aureus en Medio Selectivo.

Medio Selectivo	Agar Vogel-Johnson	Agar Manitol-sal	Agar Baird- Parker
Características Morfológicas de las colonias	colonias negras rodeadas de una zona amarillenta	colonias amarillas con zonas amarillas	colonias negras, brillantes, rodeadas por zonas claras de 2-5mm
Tinción de Gram	cocos positivo (en racimos)	cocos positivos (en racimos)	cocos positivos (en racimos)

Tabla 2. Características Morfológicas de Pseudomonas aeruginosa en Medio Selectivo.

Medio Selectivo	Agar Cetrimida	Agar de Pseudomonas para detección de fluorescencia	Agar de Pseudomonas para detección piocianina
Características Morfológicas de las colonias	Generalmente verdes	Generalmente incoloras a amarillentas	Generalmente negras
Fluorescencia bajo LUV	Verde	Amarillenta	Azul
Prueba de oxidasa	Positiva	Positiva	Positiva
Tinción de gram	Bacilos Negativos	Bacilos Negativos	Bacilos Negativos

Tabla 3: Características Morfológicas de Especies de Salmonella Sobre Agar Selectivo.

Medio	Descripción de la colonia
Agar verde brillante	Pequeña, transparente, incolora o rosada a blanco opaco (frecuentemente rodeada por un área de color rosado o blanco)
Xilosa-Lisina Desoxicolato	Rojas, con o sin centros negras
Agar Sulfito de Bismuto	Negras o verdes.

Tabla 4: Características Morfológicas de Escherichia coli sobre Agar EMB

Morfología característica de la colonia	Colonias Oscuras verde metalico
Tinción de Gram	Bacilos negativos (coco- bacilos)



20 Glosario

Aflatoxinas: Sustancia toxica y cancerígena producida por hongos.

Agar Cetrimida: Es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

Agar Macconkey: Es un agar primario, selectivo y diferencial el cual contiene el colorante violeta cristal que inhibe el crecimiento de las bacterias grampositivas y de los hongos y permite el desarrollo de bacilos gramnegativos

Agar Sabouraud: Medio utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos, patógenos y saprofitos.

Ascosporas: (Bot). Espora formada en el interior de otra célula llamada asca.

Barakol: Es un componente activo extraído de las flores de las plantas llamada *Cassia Siamero* nace en el sureste de Asia.

Endotoxinas: (Bioquímica). Toxina retenida en el cuerpo vivo de las bacterias, que no se separa de ellas sino por disgregación de la misma.

Furúnculos: Inflamación del folículo piloso de origen bacteriano con producción de pus y muerte del tejido.

Galactogogo: Son sustancias que ayudan a mantener la tasa de síntesis de la leche materna.

Impétigo: Infección de la piel por estreptococos o estafilococos, se caracteriza por la aparición de una o más lesiones ulceradas en la piel, casi siempre cubierta por una costra color piel.

Lisostafina: Es una mezcla de enzimas peptidasas y lizosimas, la cual escinde los puentes de entrecruzamiento del pentapeptido rico en glicina en el peptidoglucano de la pared celular estafilocócica.

Mastitis: Inflamación de la mama.

Micotoxinas: Sustancia toxica producida por hongos.



Micelio: (Bot). Talo de los hongos formados comúnmente de filamentos muy ramificados, hifas; hay micelios reproductores que crecen a la superficie externa del medio y micelios vegetativos que crecen hacia abajo y se encargan de la absorción de los nutrientes.

Piomelanina: Es un pigmento de coloración pardo a negro producido por cepas de *P. aeruginosa*.

Piorrubina: Es un pigmento de coloración roja producido por cepas de *P. aeruginosa*.

Pioverdina: Es un pigmento de coloración amarilla producido por cepas de *P. aeruginosa*.

Quercetina: Es un flavonoide tricíclico polihidroxilado.

Reactivo de Drangendorff: Se utiliza para la detección de Alcaloides dando una coloración naranja rojiza

Tripticasa (Triptona): Medio de cultivo recomendado para la recuperación y aislamiento de bacterias grampositivas y gramnegativas.

UFC: (Unidad Formadora de Colonia). Representa cada colonia contada y su número total representa el número total de bacterias viables en la muestra.

Vogel Johnson: Es un agar manitol salado modificado, con telurito de potasio selectivo, para la recuperación e identificación de *S. aureus*.