

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN – LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

MONOGRAFÍA

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

TEMA:

Valoración de la efectividad antimicrobiana in Vitro del extracto de semilla de toronja comercializado como agente conservador.

AUTORES:

Bra. ROSA EMILIA OPORTA LEIVA

Bra. EDEL MARIA OPORTA OPORTA

Bra. INDIANA FABIOLA RODRÍGUEZ DÁVILA

TUTOR:

Lic. KELVIN NUÑEZ

ASESORA:

Dra. CLARISA DE QUINTANILLA.

LEON-NICARAGUA FEBRERO 2009

i. DEDICATORIA

A Dios y Padre celestial:

Por conservarnos con vida, con salud, dándonos inteligencia, y nos ha guiado y cuidado en todo este proceso hasta hoy.

Te dedico mi trabajo y mi vida para que todo lo que emprenda pueda ser de bendición.

A mis padres:

José Leonidas Oporta (q.e.p.d) y Rosa Emilia Leyva, quienes me instaron siempre a alcanzar mis metas, brindándome su apoyo cuando mas lo necesite y con un digno ejemplo lograron hacer de mi la persona que ahora soy. A ellos, por instruirme en los caminos del señor y enseñarme que no soy nada sin él.

A mis hermanos:

Por su ayuda incondicional en los momentos que mas los necesite, dándome ánimo y comprensión en este largo camino. Por ser mas que hermanos, siendo los padres que están a tu lado en todo momento para apoyarte y corregirte.

A mis amigas y compañeras de tesis:

Por estar juntas aun en los malos momentos, por todo su empeño para que este trabajo fuese todo un éxito y por haberme permitido aprender de ellas y darles un poco de mí.

Dedicada a:

Familiares, compañeros, amigos, maestros y a todas las personas que hicieron posible que este sueño pudiera ser una realidad.

Rosa Emilia Oporta Leiva

A Dios todo poderoso:

Por guiarme hacia el éxito y estar a mi lado en los momentos de tempestad, mostrándome su amor y su fidelidad.

A mi madre Martha Oporta:

Por todo su amor, empeño y sacrificio para hacer de mi una persona de bien, por su esfuerzo inagotable para poder lograr este triunfo.

A mi abuelita Carmen Jarquín:

Por su apoyo incondicional siendo más que una madre para mi, instruyéndome a lo largo de toda mi vida en el camino del bien.

A mis hermanos, Juan Carlos Oporta y Gabriela Oporta:

Por ser pacientes conmigo y vivir a mi lado los momentos más importantes de mi vida, conformando una familia llena de fe y amor.

A mi tía, Yolanda García:

Por su cariño y afecto brindado a lo largo de toda mi vida.

Edel María Oporta Oporta

A Dios Padre Todopoderoso y la Virgen María:

*Por colmarme de bendiciones día con día, iluminarme en todo el
Trayecto de mi carrera, por darme fuerzas, para Seguir adelante y sobre pasar
todas las dificultades*

A mi padre:

*Leonel Rodríguez, por comprenderme y ayudarme cuando más era necesario y
estuvo ante todo momento apoyándome*

A mi madre:

*Flora Dávila, por brindarme su apoyo incondicional, por enseñarme a
Luchar para lograr mis objetivos, y por depositar en mí su confianza
Gracias mamá.*

A mis hermanos:

*Víctor y Mahalia, Por estar siempre a mi lado dándome ánimos para seguir
adelante en todo momento.*

A mis compañeras de tesis y amigas:

*Rosita y Edel, por su amistad y cariño, por haber permanecido siempre juntas
para Lograr nuestra meta y saber comprenderme cuando las cosas eran difíciles.*

Dedicada a:

*A todas aquellas personas que me apoyaron, mi familia, amigos y amigas,
compañeras de estudio. A todas aquellas personas que me impulsaron con su
cariño y amor a seguir adelante con quienes compartí gratos momentos de mi
vida, gracias por siempre.*

Indiana Fabiola Rodríguez Dávila

ii. AGRADECIMIENTO

En primer lugar a Dios, por su misericordia, su amor, sus promesas, porque nos diste fuerzas cada día, en las dificultades paz y seguridad en los problemas.

Te damos gracias porque desde el inicio de esta carrera no nos has dejado ni un solo instante, guiándonos y enseñándonos a hacer tu voluntad. Gracias padre por tu infinito amor para con nosotras.

A nuestros padres, por su dedicación y todo el esfuerzo que han hecho al suministrarnos su amor y los recursos financieros necesarios para la realización de este estudio de tesis.

A nuestro tutor, Lic. Kelvin José Núñez por habernos dado la oportunidad de realizar este trabajo bajo su excelente dirección, aportándonos todos sus conocimientos y experiencias adquiridas a lo largo de su desempeño laboral como docente de esta facultad.

A nuestra asesora, Dra. Clarisa de Quintanilla por brindarnos su tiempo, conocimientos y apoyo incondicional en su asesoría, con el gran cariño que tiene para todos sus estudiantes y tesis, apoyándolos siempre.

Agradecemos a todas y cada una de aquellas personas que a lo largo de estos cinco años de carrera nos brindaron su apoyo económico, moral y espiritual, contribuyendo de esta manera con nuestra formación personal y profesional.

Muchas Gracias!!!!

INDICE GENERAL

I. DEDICATORIA.....	II
II. AGRADECIMIENTO	V
INDICE GENERAL	VI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
2.1 OBJETIVO GENERAL:	2
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	2
III. MARCO TEORICO	3
3.1 EXTRACTO DE SEMILLA DE TORONJA COMERCIAL	3
3.2 TORONJA	4
3.2.1 <i>Extracto de semilla de toronja</i>	4
3.3 ANTIMICROBIANOS O CONSERVADORES NATURALES	5
3.3.1 <i>Conservador</i>	6
3.3.2 <i>Modo de acción de los agentes antimicrobianos de origen natural</i>	6
3.3.3 <i>Clasificación de antimicrobianos naturales</i>	6
3.3.4 <i>Antimicrobianos naturales de origen vegetal</i>	7
3.3.5 <i>Eficacia de los agentes antimicrobianos</i>	7
3.4 ANTIMICROBIANOS O CONSERVADORES SINTÉTICOS	8
3.4.1 <i>Parabenos</i>	9
3.4.2 <i>Metilparabeno (metil 4-hidroxibenzoato)</i>	10
3.4.3 <i>Propilparabeno (propil 4-hidroxibenzoato)</i>	10
3.4.4 <i>Requisitos de los agentes conservadores sintéticos</i>	10
3.5 CONTROL DE CRECIMIENTO MICROBIANO	11
3.5.1 <i>Pruebas de eficacia antimicrobiana</i>	11
3.5.2 <i>Determinación del límite de tolerancia microbiana</i>	13
3.6 MICROORGANISMOS DE PRUEBA	13
3.6.1 <i>Escherichia coli</i>	13
3.6.2 <i>Salmonella spp.</i>	14
3.6.3 <i>Shiguella</i>	14
3.6.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
3.6.5 <i>Candida albicans</i>	16

3.7 MEDIOS DE CULTIVOS	16
3.7.1 Medios sólidos	17
3.7.2 Preparados en el laboratorio a partir de medios deshidratados	17
3.7.3 Medios de cultivo según SABORAUD:.....	17
3.7.4 Agar de Digerido de Caseína-Soja.....	18
3.7.5 Factores que afectan el crecimiento de microorganismos en los medios de cultivo.....	19
3.8 SUSPENSIONES NORMALIZADAS O ESTANDARIZADAS / PREPARACIÓN DEL INOCULO	20
IV. HIPOTESIS	21
V. DISEÑO METODOLOGICO	22
5.1 TIPO DE ESTUDIO: EL PRESENTE ESTUDIO REALIZADO ES DE TIPO EXPERIMENTAL.	22
5.2 UNIVERSO: TODAS LAS ESPECIES VEGETALES QUE PRESENTEN PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS.	22
5.2.1 Población:.....	22
5.2.2 Muestra:	22
<i>Extracto de semilla de toronja solución comercial 5%</i>	22
5.3 ÁREA DE ESTUDIO:	22
5.4 UNIDAD DE ANÁLISIS: EXTRACTO DE SEMILLA DE TORONJA COMERCIAL.	22
5.5 PROCEDIMIENTO:	22
5.5.1 Preparación de cristalería.....	22
5.5.2 Demostrar la efectividad antimicrobiana del extracto:	23
5.5.3 Ensayo de actividad antimicrobiana según método de Mitscher.....	23
5.6 DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE TOLERANCIA:	25
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
VII. CONCLUSIONES.....	33
VIII. RECOMENDACIONES	34
IX. BIBLIOGRAFIA	35
X. ANEXOS	37

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectividad antimicrobiana del extracto de semilla de toronja a concentración de 1000 µcg/ ml.....	26
Tabla 2. Efectividad antimicrobiana de Metil y Propilparabeno a concentración de 1000 µcg/ ml	26
Tabla 3. Resultados de valores de tolerancia expresados en µcg/ ml	27
Tabla 4. Resultados de valores de tolerancia expresados en µcg/ ml	28
Tabla 5. Resultados de valores de tolerancia expresados en µcg/ ml	29
Tabla 6. Resultados de valores de tolerancia expresados en µcg/ ml	30
Tabla 7. Resultados de valores de tolerancia expresados en µcg/ ml	31
Tabla 8. Resultados del control de ambiente expresado en ufc/ ml.....	32



I. INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica ha venido innovando en cuanto a variedad de productos sintéticos y muy poco para los de origen natural, sin embargo estos últimos no han tenido el impacto deseado; según la reglamentación técnica centro americana (RTCA), para que un producto pueda considerarse 100% natural, todos y cada uno de sus componentes deberá ser de origen natural. Aunque actualmente no se cumple con dicho requisito pues aún no se ha podido encontrar un agente conservador natural que contenga las propiedades necesarias para sustituir a los agentes conservadores sintéticos (parabenos), siendo éste uno de los principales problemas presentes en la industria fitofarmacéutica.

Existe alguna variedad de agentes conservadores utilizados en la industria de los alimentos, si bien la industria fitoterápica no es muy propia de dicha línea, ocasionalmente se omite que sus materias primas igualmente son de origen natural.

Existen reportes de algunas observaciones realizada en 1972 por el físico Dr. Jacob Harish, el cual haciendo pruebas de campus en el jardín de su casa descubrió más bien por casualidad que las semillas de toronja no se pudrían, como todas las demás, e intrigado, comenzó un estudio lo que le permitió deducir de que los componentes de esta simple semilla aportaban propiedades germicidas, siendo esto quizá el inicio de una nueva alternativa para los productos de origen natural que aún no cuentan con agentes conservadores del mismo origen.

En el desarrollo de esta investigación, se pretende comprobar las propiedades antimicrobianas de un producto natural. El producto seleccionado es el Extracto de Semilla de Toronja (EST); a éste se le atribuye un sin número de propiedades, dentro de las cuales se destaca como un potente antimicrobiano de amplio espectro, altamente efectivo. El propósito es evaluar las propiedades antimicrobiana, contrastarlo con agentes conservadores sintéticos y determinar los valores de tolerancia a dicho extracto, mediante ensayo microbiológico *in Vitro*. Aportando así una base para futuras investigaciones, lo cual representaría una gran ayuda para la industria fitofarmacéutica. De esta manera en lugar de parabenos de origen sintético se utilizarían conservantes naturales, siendo mucho mas beneficiosos; ya que estos productos son de bajo costo y menos perjudiciales para la salud de los consumidores.



II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

Realizar un ensayo in Vitro del extracto de semilla de toronja (EST) para comprobar la efectividad antimicrobiana, contrastarla con agentes conservadores sintéticos y determinar su límite de tolerancia.

2.2 Objetivos Específicos:

- Comprobar las propiedades antimicrobianas descritas en la literatura del extracto de semilla de toronja como agente conservador.
- Contrastar la actividad antimicrobiana del extracto de semilla de toronja con agentes conservadores sintéticos (metil y propilparabeno)
- Determinar el límite de tolerancia para dicho extracto.



III. MARCO TEORICO

3.1 Extracto de semilla de toronja comercial

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

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

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

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

En su acción es poderoso y de amplio espectro, actúa eliminando microorganismos aún a bajas diluciones. Con mayor acción residual que los otros compuestos utilizados hasta ahora. Óptima estabilidad, en Ph bajo y temperatura hasta 130°C. Es estable a cambios de luz. Es biodegradable al 100% tanto en aguas duras como suaves. No es tóxico, ni para el ser humano ni para los animales. No contamina el ambiente como otros productos tradicionales. No permite la aparición de cepas resistente a su acción germicida. No es antibiótico. Tiene un poder de penetración rápido y eficaz. Es selectivo y actúa únicamente sobre microorganismos patógenos por su naturaleza. Altamente económico

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



3.1.1 Descripción del extracto de semilla de toronja como perseverante

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

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

3.2 Toronja

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

3.2.1 Extracto de semilla de toronja

El extracto orgánico comercial de semilla de toronja refiere ser un compuesto antimicrobiano de amplio espectro no tóxico.

Algunas atribuciones refieren ser:

- Se considera de amplio espectro antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas y negativas, hongos, virus y protozoos.
- Se considera que su poder de efectividad oscila En general de 200 a 2000 partes por millón (ppm).
- El EST es seguro y no tóxico incluso a dosis mucho más altas de las recomendadas.
- El EST es un producto natural derivado de las semillas, pulpa y membranas blancas de la toronja.
- Es un producto que muy rara vez da lugar a reacciones alérgicas. El EST siempre debe ser tomado diluido por su potencial acidez.
- Garantiza un adecuado balance interno y externo con la naturaleza.



- El EST puede ser combinado con una gran cantidad de plantas medicinales con efectos sinérgicos a ellas. A su vez, el poder antimicrobiano del EST lo posibilita como un gran conservante de la potencia y eficacia de las plantas con las que se asocia.

3.3 Antimicrobianos o conservadores naturales

La demanda de productos farmacéuticos de calidad se ha incrementado con el crecimiento de la población mundial de manera considerable, esto a su vez, implica un cambio en el estilo de vida y aun más, un compromiso de la industria misma

Sin embargo a pesar de las diferentes técnicas de conservación disponibles, la alteración de fármacos y fitofármacos por parte de los microorganismos es un problema no controlado del todo.

El uso de agentes químicos ha sido uno de los métodos de conservación más antiguos y tradicionales que existen, sin embargo, no cumple con el concepto de natural o seguro que los consumidores demandan.

La sociedad actual, demanda también, productos con menos aditivos químicos ya que, algunos de estos son sospechosos de poseer algún grado de toxicidad. Es así que la industria fitofarmacéutica se esfuerza por remover completamente el uso de antimicrobianos químicos y adoptar alternativas naturales para el mantenimiento o extensión de la vida útil de sus productos.

Cada vez más se reconoce la actividad antimicrobiana de algunos tipos de plantas. El papel de la investigación es fundamental en este punto, y es necesario que los consumidores reciban la mayor información posible sobre estas técnicas para evitar recelos al consumo del producto. Una amplia variedad de sistemas antimicrobianos naturales, han sido desarrollados a partir de microorganismos, plantas y animales, muchos de los cuales ya han sido empleados para la conservación de alimentos y otros están siendo investigados para futuras aplicaciones en productos fitofarmacéuticos.

Plantas, hierbas y especias, así como sus aceites esenciales, contienen un gran número de sustancias con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias, levaduras y mohos, reportándose más de 1340 plantas como potenciales fuentes de antimicrobianos. Estos compuestos pueden ser letales para las células microbianas o simplemente servir como inhibidores de la producción de metabolitos.



3.3.1 Conservador

Un agente conservador es una sustancia de amplio espectro que al ser añadida en determinada proporción a los alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos, evitan la vida o proliferación de los microorganismos y de esta manera minimizan el deterioro o contaminación (inadvertida) de los productos, disminuyendo el riesgo para la salud de los consumidores.

Los sitios de acción de los agentes antimicrobianos en la célula microbiana, incluye a la membrana celular, pared celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético, todos ellos, sitios estratégicos para la supervivencia de los microorganismos y cualquier acción sobre ellos puede inactivar a la célula microbiana. Los compuestos utilizados como antimicrobianos tienen varios sitios de ataque dentro de las células microbianas y que dependiendo de las concentraciones utilizadas, pueden causar la inactivación o inhibición de los microorganismos.

3.3.2 Modo de acción de los agentes antimicrobianos de origen natural

Conner (1893) sugirió que la actividad antimicrobiana de los agentes conservadores se basa en el deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluidos aquellos involucrados en la producción de energía y en la síntesis de compuestos estructurales. Una vez que el compuesto cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y con las proteínas causando un flujo contrario de protones a través de ella, afectando así la actividad celular.

Kabara (1991), menciona que los efectos de estos compuestos pueden ser a dos niveles, sobre la integridad de la pared celular y membrana citoplasmática así como sobre la respuesta fisiológica del microorganismo. Estos pueden desnaturalizar a las enzimas responsables del inicio de la germinación de las esporas o interferir con el uso de aminoácidos necesarios para iniciar el proceso de germinación.

Existen pocos estudios enfocados a comprender el mecanismo involucrado en la inhibición microbiana por especies vegetales. Sin embargo, se supone que dada la estructura fenólica de muchos de los compuestos con actividad antimicrobiana presentes en las especies, el modo de acción debe ser similar al de otros compuestos vegetales.

3.3.3 Clasificación de antimicrobianos naturales

- De origen animal
- De origen vegetal
- De origen microbiano



3.3.4 Antimicrobianos naturales de origen vegetal

Dentro de los compuestos antimicrobianos de origen natural existe una variedad dentro de los más importantes se pueden mencionar:

- Fitoalexinas
- Ácidos orgánicos
- Especies
- Aceites esenciales.

3.3.5 Eficacia de los agentes antimicrobianos

Existe un numero importante de reportes a cerca de la actividad antimicrobiana de extractos, aceites y especias, es difícil hacer estimaciones cuantitativas y hacer comparaciones de sus efectos debido, al menos parcialmente, a la gran variedad de métodos que se han utilizado para evaluar su efectividad.

Para la aplicación de los antimicrobianos de origen natural, se necesita comprobar su eficacia *in Vitro*, en medios microbiológicos. Las pruebas *in Vitro* proporcionan información valiosa a cerca de la efectividad de un compuesto, y pueden ser evaluadas de igual manera, las variables que afectan a la actividad antimicrobiana, la cual depende, como se ha visto, del tipo, genero y especie, y microorganismo a probar. Por ejemplo las esporas bacterianas, son más resistentes al efecto de los antimicrobianos que las células vegetales.

Debido a que la mayoría de los antimicrobianos son bacteriostáticos más que bactericidas. Los agentes antimicrobianos de origen natural no contribuyen al desarrollo de cadenas de resistencia o alteración del ambiente de manera que crezcan otros organismos patógenos.

Algunos de los factores intrínsecos y extrínsecos o variables asociadas a la aplicación de los agentes antimicrobianos se determinan en las pruebas *in Vitro*. Estas incluyen temperatura, pH, potencial de óxido-reducción y actividad de agua. Para el éxito de estas pruebas, se requiere que estos factores sean controlados.

El tiempo de exposición debe ser cuidadosamente controlado para establecer resultados significativos. El efecto de la temperatura es muy importante durante la incubación y la exposición. En la mayoría de los casos, el incremento de la temperatura de exposición incrementa la actividad del antimicrobiano. La temperatura de incubación debe ser la óptima para los microorganismos de prueba. La composición de la atmósfera, juega un rol muy



importante, es necesario definir si el microorganismo es anaerobio o no. La actividad de los antimicrobianos se ve afectada de igual manera por el pH, generalmente la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos se atribuye principalmente a su forma no disociada.

Compuestos antimicrobianos que poseen efecto sobre la actividad enzimática:

- Compuestos específicos
 - Isotiocianatos
 - Alicina
 - Fenoles y polifenoles
- Fenoles simples
- Derivados del ácido hidroxicinámico
- Flavonoides
- Taninos
- Antioxidantes fenólicos

3.4 Antimicrobianos o conservadores sintéticos

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

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

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

La actitud de la industria cosmética en los Estados Unidos previa a los años 60 era que si un producto no olía mal y se veía bien, era un buen producto. Esta actitud cambió a mediados de los 60 cuando comenzaron a probarse los productos para el cuidado de la piel y el cabello contra la contaminación microbiana. Los resultados fueron sorprendentes; casi la mitad de los productos que compraban los consumidores estaban contaminados con microorganismos. Este hallazgo llevó a los fabricantes a buscar maneras de conservar sus productos, no sólo para la seguridad de sus clientes, sino también para extender el ciclo útil de los productos.

Se inició así la búsqueda de nuevos conservadores químicos que fueran baratos y eficaces en una variedad de fórmulas. Para satisfacer esta demanda, los científicos descubrieron algunos químicos complejos como los parabenos, el formaldehído, el fenoxietanol, los sorbatos y otras moléculas orgánicas complejas que se llegaron a conocer como conservadores sintéticos convencionales.



Dentro de los conservadores ampliamente utilizados se pueden mencionar los siguientes:

Agentes conservadores	concentración efectiva
Acido benzoico	0.1- 0.2%
Acido sórbico	0.1- 0.2%
Benzoato de sodio	0.1- 0.2%
Metil-parabeno	0.1%
Propil-parabeno	0.0 5%

3.4.1 Parabenos

De todos los conservantes conocidos, estos son los que han sido más estudiados y los que tienen mayor aplicación farmacéuticas e industrial.

Los mas empleados en farmacia son los esterres metilicos y propilicos del ácido p-hidroxibenzoico, comercialmente conocidos como nipagyn y nipazol; que en concentraciones adecuadas, estos evitan el crecimiento de toda clase de microorganismos.

Los esterres del ácido p-hidroxibenzoico que se utilizan, casi siempre en forma de solución conservadora, son totalmente atóxicos cuando se aplican por vía oral, pues no se absorben solo ligeramente por los materiales elásticos, pero su actividad resulta notablemente disminuida por tensoactivos y macromoléculas, sobre todo por los óxidos de polietileno.

Con respecto al efecto producido por la asociación de estos, esta demostrado que los homólogos tienen mayor solubilidad, razón por la cual su empleo esta mas extendido. Si se observan las propiedades físicas-químicas de los parabenos, se nota que éstos son los que más se aproximan al conservador ideal, pues estos son:

- incolores
- inodoros
- insípidos
- no reactivos
- neutros en solución
- atóxicos
- efectivos en una amplia gama de pH.



3.4.2 Metilparabeno (metil 4-hidroxibenzoato)

Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas o tecnológicas:

Es utilizado como un preservante antimicrobiano en cosméticos y productos alimenticios y formulaciones farmacéuticas; usado en combinación con parabenos y otros agentes antimicrobianos. El metilparabeno es el más frecuentemente usado como preservante antimicrobiano. Los parabenos son efectivos a un rango variable de pH y tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana.

Usos: Utilizado en formulaciones farmacéuticas I.M, I.V, preparaciones oftálmicas, soluciones orales y suspensiones, preparaciones tópicas y vaginales.

3.4.3 Propilparabeno (propil 4-hidroxibenzoato)

Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas o tecnológicas:

Es utilizado como un preservante antimicrobiano en cosméticos y productos alimenticios y formulaciones farmacéuticas; usado en combinación con parabenos y otros agentes antimicrobianos. El propilparabeno es el más frecuentemente usado como preservante antimicrobiano. Los parabenos son efectivos a un rango variable de pH y tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana.

Usos: Utilizado en formulaciones farmacéuticas I.M, I.V, Preparaciones oftálmicas, soluciones orales y Suspensiones, preparaciones tópicas y vaginales.

3.4.4 Requisitos de los agentes conservadores sintéticos

Para las sustancias químicas utilizadas en la estabilización microbiana de medicamentos se han establecidos los siguientes requisitos:

- Tolerancia fisiológica, las concentraciones utilizadas no deben presentar signos tóxicos, alérgicos o de sensibilización.
- Compatibles con las sustancias activas y coadyuvantes. Dentro de este requisito se comprenden también la exigencia de que no se produzca inactivación o solo insignificativamente, por los materiales de envasado, inclusive micelas, tensoactivos.
- Olor y sabor, los conservadores deben ser insípidos e inodoros.
- Espectro activo. Deben ser activo como bacteriostático o bactericida y como fungistático o fungicida.
- Estabilidad química.



3.5 Control de crecimiento microbiano

Para controlar el crecimiento de los m.o. se pueden emplear dos estrategias:

- a) eliminar los m.o. presentes.
- b) impedir su multiplicación.

La acción de los agentes de control depende a grandes rasgos de los siguientes factores:

- el tipo de m.o. que se quiere controlar y la carga inicial del mismo.
- la dosis del agente, que involucra la concentración o intensidad aplicada durante un determinado tiempo.
- el medio en el cual se encuentran los m.o.

3.5.1 Pruebas de eficacia antimicrobiana

Los conservantes antimicrobianos son sustancias agregadas a las formas farmacéuticas no estériles para protegerla del desarrollo microbiano o de microorganismos que se introducen sin ser advertidos durante el proceso de fabricación o después de éste. Los conservantes antimicrobianos no deben emplearse en lugar de las buffer o solamente para reducir la población microbiana viable de un producto no estéril o para controlar la biocarga antes de la esterilización de formulaciones multidosis durante la fabricación.

Todos los agentes antimicrobianos útiles son sustancias tóxicas. Para la máxima protección de los pacientes, para la concentración del conservante que se indique como eficaz en el producto envasado final debe de ser inferior al nivel que pueda resultar tóxico para los seres humanos.

La concentración de un conservante antimicrobiano agregado puede mantenerse al mínimo si los ingredientes activos del formulario poseen eficacia antimicrobiana intrínseca. La eficacia antimicrobiana, ya sea inherente al producto o producida por la adición de un conservante antimicrobiano, debe ser demostrada para todos los productos que contengan conservante antimicrobiano. Los conservantes antimicrobianos deben estar indicados en la etiquetas.

Los microorganismos viables empleados en la prueba no deben de haber sufrido más de 5 pasajes desde su extracción del cultivo original de ATCC para los fines de la prueba un pasaje se define como la transferencia de microorganismos desde un cultivo establecido a un medio nuevo.

Todas las transferencias se encuentran, en el caso de organismos mantenidos mediante técnicas de siembra, en lotes.



Cada ciclo consiste en congelar y descongelar y revivir a los microorganismos en un medio nuevo se considera como una sola transferencia. Para el almacenamiento de cultivos a largo plazo se debe emplear una técnica de siembra a partir del cultivo madre. Los cultivos recibidos de ATCC se deben revivir de acuerdo con las instrucciones.

Los cultivos de trabajo entonces pueden ser empleados de forma periódica (todos los días en el caso de bacterias y levaduras) para iniciar el cultivo de inóculos.

Organismo	Medio Apropriado	Temperatura de Incubación	Inóculo Tiempo de Incubación	Recuperación Microbiana Tiempo de Incubación
<i>Echerichia. coli</i> (ATCC N° 8739)	Caldo de Digerido de Caseína Soja. Agar DCS	32,5 +/- 2,5°C	18 a 24 horas	3 a 5 días
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC N° 6538)	Caldo de Digerido de Caseína Soja. Agar DCS.	32,5 +/- 2,5°C	18 a 24 horas	3 a 5 días
<i>Shiguella sonnie</i> (ATCC N° 1432)	Caldo de Digerido de Caseína Soja. Agar DCS.	32,5 +/- 2,5°C	18 a 24 horas	3 a 5 días
Salmonella.t hiphy (ATCC N° 14028)	Caldo de Digerido de Caseína Soja. Agar DCS.	32,5 +/- 2,5°C	18 a 24 horas	3 a 5 días
<i>Candida. albicans</i> (ATCC N° 1231)	Agar Sauboraud-Dextrosa. Caldo Sauboraud-Dextrosa.	22,5 +/- 2,5°C	6 a 10 días	3 a 7 días



3.5.2 Determinación del límite de tolerancia microbiana

Cabe mencionar que el concepto de límites de tolerancia surge en el contexto de problemas en los que se requiere el conocimiento de un valor mínimo o máximo para una variable de interés. El límite inferior de tolerancia se define como un valor de la variable para el cual se puede afirmar, con una determinada confianza, que es superado por una alta proporción de la población. De un modo similar se define el límite superior de tolerancia.

3.6 Microorganismos de prueba

Al iniciar un método microbiológico es imprescindible contar con cepas de microorganismo control que constituyen el reactivo estándar biológicos. Estos microorganismos normalmente serán los necesarios para la comprobación de los métodos de control de productos no estériles y estériles, los aislados frecuentemente en las zonas de fabricación o los utilizados para valoraciones de antibióticos y ensayo de eficacia de la conservación antimicrobiana.

Organismos ensayados: Bacterias Gram (+) (A: *Staphylococcus aureus*; Bacterias Gram (-) (B: *Salmonella typhi*; E: *Shigella*; C: *E. coli*) Levaduras (F: *Candida albicans*)

3.6.1 *Escherichia coli*

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especie: *E. coli*

Este organismo originalmente fue llamado, *Bacterium coli*, y fue identificado a partir de las heces fecales de infantes. Fue bautizado en 1920 con el nombre de su descubridor. Se ha identificado como la responsable de cuadros diarreicos en los seres humanos y en los animales.

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



3.6.2 *Salmonella spp.*

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Salmonella*

Salmonella, es un género de bacteria que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, formado por bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos y que no desarrollan cápsula ni esporas. Son bacterias móviles que producen sulfuro de hidrógeno (H₂S). Fermentan glucosa por poseer una enzima especializada, pero no lactosa, y no producen ureasa.

Es un género de bacteria que frecuentemente contamina agua y alimentos, provoca infección aguda gastrointestinal: con fiebre, vómito, diarrea y deshidratación severa. Su detección en alimentos indica ausencia de calidad sanitaria en la elaboración, manejo y consumo de alimentos. Se reporta que es uno de los comunes orígenes de la morbilidad y la mortalidad en países en desarrollo, especialmente en Latinoamérica.

Este género bacteriano tiene una alta capacidad de supervivencia en el ambiente, por ello su transmisión es relativamente sencilla, durante la preparación y consumo de bebidas y alimentos, cuando se tienen problemas o sencillamente no existe drenaje, las aguas residuales contaminan fuentes de tipo potable. Así como las que se utilizan para riego de vegetales, que se consumen crudos en zonas rurales y sitios urbanos marginados.

3.6.3 *Shigella*

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Shigella*

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



La *Shigella* invade su hospedador penetrando las células epiteliales del intestino delgado. Usando un sistema de secreción específico, la bacteria inyecta una proteína llamada *Ipa*, en la célula intestinal, lo que subsecuentemente causa lisis de las membranas vacuolares. Utiliza un mecanismo que le provee de motilidad en la que se dispara una polimerización de actina en la célula intestinal, como un chorro de propulsión lo haría en un cohete, contagiando una célula después de la otra.

3.6.4. *Staphylococcus aureus*

Reino: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Staphylococcaceae

Género: *Staphylococcus*

Especie: *S. aureus*

Staphylococcus aureus (estafilococo áureo) es una bacteria que se encuentra en la piel y fosas nasales de las personas sanas, que causa gran variedad de infecciones, desde infecciones menores de la piel (forúnculos, ampollas, vejigas) y abscesos cutáneos hasta enfermedades que pueden poner en peligro la vida como neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome del shock tóxico (SST) y sepsis.

Es un coco que crece agrupado en racimos (de ahí su raíz "Staphylo"), que responde positivamente a la tinción de Gram, es aerobio y anaerobio facultativo por lo que puede crecer tanto en una atmósfera con oxígeno y también sin el mismo, no presenta movilidad ni forma cápsula. Es capaz de crecer hasta con un 10 % de sal común. Por esto puede crecer en el agua del mar. Produce la fermentación láctica. Es catalasa positivo y coagulasa positivo.

El *S. aureus* es un coco inmóvil, de 0.8 a 1 micrómetro de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas. En extendidos de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o en cadenas cortas. Los racimos irregulares son característicos de extendidos tomados de cultivos que se desarrollan en medios sólidos, mientras que en otros cultivos son frecuentes las formas de diplococos y en cadenas cortas. Unas pocas cepas producen una capsula o capa de baba que incrementa la virulencia del microorganismo. El *S. aureus* es un microorganismo grampositivo, pero las células viejas y los microorganismos fagocitados se tiñen como gramnegativos.



3.6.5. *Candida albicans*

Reino: Fungi

Filo: Deuteromiceta

Subfilo: Saccharomycotina

Clase: Saccharomycetes

Orden: Saccharomycetales

Familia: Saccharomycetaceae

Género: *Candida*

Especie: *C. albicans*

La *Candida albicans* es un hongo diploide asexual (forma de levadura), saprófito de la familia de los Sacaromicetos. Normalmente se encuentra en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Está envuelta en un rol relevante en la digestión de los azúcares mediante un proceso de fermentación.

La *Candida albicans* puede asumir patogeneidad provocando la candidiasis; en ese caso se presenta como una afección vaginal (vaginitis), de la cavidad oral (muguet), del intestino o de la piel.

En un físico debilitado, inmunodeprimido o convaleciente de un larga cura antibiótica, la *Candida* se multiplica en modo anómalo y, atraviesa el intestino, para entrar al torrente sanguíneo, donde libera sus propias toxinas provocando la candidemia. Este fenómeno da lugar a síntomas algunos abdominales, mala digestión, gases e hinchazón, molestias intestinales (estreñimiento o diarrea), intolerancia alimentaria, irritabilidad, insomnio, pérdida de la memoria, dolores de cabeza y depresión.

3.7 Medios de cultivos

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

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta: sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir ni *in Vitro* ni *in vivo*. También se debe añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) no son completamente autotróficas cuando se desarrollan en estas condiciones.



3.7.1 Medios sólidos

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

1. Agar: es una mezcla de polisacáridos extraídos de un alga marina. Tiene una elevada masa molecular, tiene la capacidad de hidratarse y formar una red. El agar interactúa con los componentes nutritivos del medio. El agar se funde a altas temperaturas (100 °C), Solidifica alrededor de los 40 °C y no se degrada con la luz. Generalmente se utiliza a una concentración de 0,6 – 1%. El principal problema con este gelificante es su elevado costo.

2. Gelrita: es un heteropolisacárido aniónico natural producido por una bacteria, que forma geles semejantes al agar. Se puede usar a una concentración de 0,15 – 0,30 %. Los geles de gelrita son notablemente más claros que los de agar, y también solidifican más rápidamente. El costo de la gelrita es menor que el del agar.

3.7.2 Preparados en el laboratorio a partir de medios deshidratados

Los medios se preparan según las indicaciones del fabricante utilizando agua purificada (como mínimo de la calidad farmacopea Europea). En este caso se exigirá el certificado analítico de cada lote de medio deshidratado. Además, el laboratorio deberá efectuar ensayos que demuestren la esterilidad y las propiedades nutritivas y selectivas de los medios de cultivos preparados a partir de medios deshidratados.

Para los medios nutritivos generales se utilizarán las cepas que se indican en la farmacopea. Para los medios selectivos se utilizarán microorganismos que presenten buen crecimiento y otros cuyo crecimiento este inhibido en este medio. Los ensayos se deberán hacer para cada lote de medio que se prepare (se entiende por lote los medios preparados en las mismas condiciones y esterilizados en una misma carga de autoclave).

3.7.3 Medios de cultivo según SABORAUD:

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



Forma de actuación:

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

Agar-maltosa 4%, según SABORAUD

Composición (g/litro):

Peptona de carne 5,0; Peptona de caseína 5,0; D (+)-Glucosa, o bien, Maltosa 40,0; Agar 15,0.

Preparación:

Disolver 65g/litro y estabilizar al autoclave. ¡No Recalentar! ¡No Fundir de Nuevo! pH: 5,6 +/- 0,1.

3.7.4 Agar de Digerido de Caseína-Soja

Peptona de Caseína 15.0 El Agar Soya Trypticaseína es un medio utilizado para promover el crecimiento de microorganismos fastidiosos y adicionado de sangre para observar reacciones hemolíticas.

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

De acuerdo con la Farmacopea, Clínicamente se utiliza para diferenciar especies de *Haemophilus* debido a que no contiene los factores X y V requeridos para su crecimiento. Así mismo este medio puede ser utilizado como base para preparar medios suplementados como el Agar Sangre y Agar Glosa Chocolate.

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

Composición (g/litro):

Peptona de Soya 5.0

Cloruro de Sodio 5.0

Agar Bacteriológico 15.0

pH 7.3 ± 0.2



Preparación:

Suspender 40 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.

Para preparar Agar Sangre, adicionar asépticamente sangre desfibrinada estéril al 5% después de esterilizar y enfriar el medio.

Almacenamiento: 2-30 Caducidad: 5 años en frasco cerrado.

3.7.5 Factores que afectan el crecimiento de microorganismos en los medios de cultivo

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

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

Para muchos microorganismos un solo compuesto (como un aminoácido) puede servir como fuente de energía, otros requieren compuestos diferentes. Es importante a su vez considerar el pH óptimo para cada especie, generalmente los microorganismos neutrófilos crecen mejor a pH 6-8, algunos acidófilos tienen pH óptimo tan bajo como 3 y otros alcalófilos pH altos como 10.5.

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



3.8 Suspensiones normalizadas o estandarizadas / Preparación del inóculo

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

Antes de la prueba, inocular la superficie de un volumen apropiado de un medio de agar sólido proveniente de un cultivo madre de cada m.o especificada revivido recientemente, las condiciones de cultivo para el inóculo se describen en la que los medios apropiados son el Medio de Agar Sabouraud - Dextrosa o de Digerido de Caseína –Soja.

Para cosechar los cultivos bacterianos y de *C. albicans*, emplear solución salina SR estéril, lavando el desarrollo de la superficie, colocando en un recipiente apropiado y agregando suficiente solución salina SR estéril para obtener recuento microbiano de aproximadamente 1×10^8 unidades formadoras de colonias (ufc) por ml.

El cálculo de concentración de inóculo se puede realizar mediante mediciones turbidimétricas a través del espectrofotómetro a una determina longitud de onda para los microorganismos de desafío. Refrigerar la suspensión si no se va a emplear dentro de dos horas. Las suspensiones bacterianas y de levaduras se deben utilizar dentro de las 24 hrs. de cosechas, pero la preparación de hongos puede ser almacenada en refrigeración hasta por siete días.



IV. HIPOTESIS

El presente estudio plantea que el extracto de semilla de toronja comercializado como agente conservador posee actividad antimicrobiana y antifúngica contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *Shiguella*, *E. coli* y *Candida albicans* a una concentración de 1000 µcg/ ml en comparación con agentes conservadores sintéticos.



V. DISEÑO METODOLOGICO

5.1 Tipo De Estudio: el presente estudio realizado es de tipo experimental y comparativo.

5.2 Universo: especies vegetales que presenten propiedades antimicrobianas.

5.2.1 Población:

Especies vegetales con actividad antimicrobiana como agente conservador tales como ajo, almendra, extracto de semilla de toronja, café, apio, cilantro, albahaca, anís, laurel, perejil, menta, sacate de limón, mostaza, comino y eneldo.

5.2.2 Muestra:

Extracto de semilla de toronja solución comercial 5%

5.3 Área De Estudio:

Departamento de control de calidad Microbiológico Facultad de Ciencias Químicas, situado en el segundo piso del edificio de la facultad de Ciencias Químicas.

5.4 Unidad de Análisis: Extracto de semilla de toronja comercial.

5.5 Procedimiento:

Para la realización del presente estudio monográfico se realizaron revisiones bibliográficas en el complejo docente de la salud (CAMPUS MEDICO); redes de información INTERNET, NAPRALET, MEDLINE; sala de consulta del departamento de análisis de drogas, medicamentos y tóxicos, así como consultas bibliográficas en el laboratorio de control de calidad de la UNAN-León.

5.5.1 Preparación de cristalería

- 1- Selección de la cristalería a utilizar (pipetas, balones aforados, Erlenmeyer, beaker, placas petri, asas, tubos de ensayo.)
 - 2- Se procedió al lavado de ésta, el cual se hizo con agua del grifo, utilizando detergente y cloro, dejándolas escurrirse hasta secado.
 - 3- Posteriormente se empacaron en papel aluminio, debidamente rotulados para ser esterilizados (autoclave 121°Cx15min).
- Esta se mantiene siempre debidamente empacada hasta el momento de su utilización.



5.5.2 Demostrar la efectividad antimicrobiana del extracto:

1. Réplica de las cepas.
2. Preparación de medios.
3. Preparación de suspensión de microorganismos.
4. Ensayo

5.5.3 Ensayo de actividad antimicrobiana según método de Mitscher.

5.5.3.1 Cultivo de microorganismos:

Con un Asa estéril se transfieren una o dos asadas de microorganismo a ensayar, a un tubo inclinado estéril que contenga 10ml de agar-caseína. Este envase se marca y se incuba a 37°C por 24 horas ésta operación se realizó sucesivamente al menos por 3 días con el objetivo de activar el metabolismo del microorganismo. En el caso de la levadura se utilizó 10ml de agar-saboraud marcado e incubado a 25°C durante 3 días.

5.5.3.2 Preparación de las muestras para el ensayo:

Se toma con precisión una cantidad del extracto 0.2 ml considerando que la dilución tenga 1000 µcg /ml.

5.5.3.3 Preparación de patrones:

Se utilizó para los patrones un medio adecuado susceptible de acorde a su solubilidad.

5.5.3.4 preparaciones de parabenos:

Se pesaron cuidadosamente 1.5 gr de cada uno de los conservantes sintéticos en estudio (metil y propilparabeno), se diluyeron en 30ml de glicerina respectivamente .la mezcla se calentó y homogenizo, dejándose en reposo por unos minutos, se llevo al autoclave por 15 minutos a 121° C. hasta esterilización completa.

5.5.3.5 Preparación de los medios:

Se utilizó como medio de cultivo para las bacterias agar-caso (agar peptonado de caseína peptanado de harina de soya). El cual se preparó suspendiendo 40g en 1000ml de agua desmineralizada (destilada, estéril) se calentó agua hasta ebullición, y se agregó el agar, se calentó la suspensión hasta que se logró una solución clara, se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121° C. Posterior a la esterilización se midió y ajustó el pH apropiado del medio 7.3 ± 0.2 a 25°C.



De igual manera se preparó el medio para la levadura, el agar-saboraud, suspendiendo 65g en 1000ml de agua desmineralizada la que se calentó a ebullición y se agregó el agar, hasta obtener una solución clara, esterilizándose en autoclave por 15min a 121°C y se sigue el procedimiento antes descrito para el ajuste de pH.

5.5.3.6 Preparación de solución salina:

Se preparó una solución salina al 0.9% de cloruro de sodio. Se autoclavó a 121°C por 15 minutos. La solución salina se puede mantener por varias semanas, en refrigeración, en recipientes debidamente cerrados y estériles.

5.5.3.7 Preparación de suspensión de microorganismos.

Para la preparación de la suspensión se necesitaron cultivos frescos de los microorganismos, se tomaron de 2 o 3 asadas del microorganismo contenidos en tubos inclinados con agar-caseína, y saboraud respectivamente. Se solubilizaron en tubos que contenían solución salina de cloruro de sodio 0.9% luego se agitaron hasta homogenizar y se midió en un espectrofotómetro (Espectronic 20) a 580nm hasta alcanzar un 25% de transmitancia. Dichas suspensiones debidamente refrigeradas pueden ser usadas una semana después de su preparación pero sin haber sido antes manipuladas. Una vez manipuladas deben desecharse el mismo día de la manipulación.

5.5.3.8 Preparación de los platos:

Después se autoclavó el agar se dejó enfriar aproximadamente a 45°C, asépticamente, se añadió 9.8ml de agar a cada plato petri, se adicionó a su vez 0.2 ml de muestra se agitó suavemente la mezcla para homogenizar lo más posible cuando el agar se solidificó; los platos se invirtieron, dejándolos reposar a temperatura ambiente. Esto permitió determinar la asepsia de los platos.

5.5.3.9 Rayado de microorganismos:

Con un aplicador estéril humedecido en la suspensión de microorganismos se procedió al rayado de los platos Petri, la suspensión debe ser agitada de tiempo en tiempo, para evitar la sedimentación, se realizó el rayado de forma horizontal, vertical, radial y de bordes. Procurando rayar completamente el plato

Cuando todos los platos se rayaron con los microorganismos se incubaron a 37°C por 24 horas, Estos se incuban de forma inversa.



5.6 Determinación de los valores de tolerancia:

Una vez que se demostró la actividad del extracto a las concentraciones establecidas según el método de Mitcher de 1000 μ g/ml, se procedió a una segunda fase que consiste en determinar el límite de tolerancia microbiana.

En la preparación de las muestras a diferentes concentraciones (900-600 μ g/ml), se realizó el ensayo por triplicado, marcando cuidadosamente cada uno de los platos petri; adicionando a estos 0.2 ml de extracto, más 9.8 ml de Agar Caseína-soja o saboraud necesarios para completar el volumen de 10 ml y así obtener las concentraciones respectivas para la realización del ensayo, incubando y realizando las lecturas correspondientes en los tiempos de estudio.



VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Efectividad antimicrobiana del extracto de semilla de toronja a concentración de 1000 µcg/ ml

Especie	Tiempo (Transcurrido en Horas, hr)											
	24	48	72	96	120	144	168	192	216	230	254	308
<i>Salmonella</i>	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	■	■	■	■
<i>St.aureus</i>	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	■	■	■	■
<i>Shiguella</i>	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	■	■	■	■
<i>E.coli</i>	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	■	■	■	■
<i>C. albicans</i>	■	■	■	■	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
Control (+)	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤
Control (-)	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
Control de ambiente	2uf/c/ml	2ufc/ml	2ufc/ml	3ufc/ml	5ufc/ml	■	■	■	■	■	■	■

Tabla 2. Efectividad antimicrobiana de Metil y Propilparabeno a concentración de 1000 µcg/ ml

Especie	Tiempo											
	24	48	72	96	120	144	168	192	216	230	254	308
<i>Salmonella</i>	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	■	■	■	■
<i>St.aureus</i>	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	■	■	■	■
<i>Shiguella</i>	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	■	■	■	■
<i>E.coli</i>	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	■	■	■	■
<i>C. albicans</i>	■	■	■	■	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
Control (+)	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤
Control (-)	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖

- ❖ Ausencia de crecimiento
- Crecimiento total
- No hubo lectura.



DISCUSIÓN:

Los resultados del presente estudio para la tabla N° 1 y 2 muestran que el extracto revela eficacia antimicrobiana a concentración de 1000 µcg/ ml a intervalos de tiempo alcanzados durante el periodo de incubación de 192 horas (8 días) para las bacterias ensayadas, y hasta las 308 horas (12 días) para la levadura; dicha eficacia fue comprobada al compararlo con metil y propilparabeno, obteniendo los mismos resultados a la misma concentración e igual tiempo de estudio. Por otra parte las respuestas obtenidas de los controles positivos (medio+agua) y negativos (medio+extracto) fueron las esperadas, pese a los datos encontrados en el control de ambiente (solamente medio de cultivo). Como podemos observar, el período de lectura para *C. albicans* inicia a partir de las 120 horas debido a que los hongos y levaduras comienzan a crecer entre las 72 y las 120 horas (de 3 a 5 días).

Tabla 3. Resultados de valores de tolerancia expresados en µcg/ ml

Concentración de extracto (EST) µcg/ ml	<i>Salmonella</i>							
	Tiempo (hrs)							
	24	48	72	96	120	144	168	192
900	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
800	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤
700	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤
600	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤
Concentración parabenos µcg/ ml	Tiempo (hrs)							
	24	48	72	96	120	144	168	192
	900	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
800	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	
700	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	
600	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	
Control (+)	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤

- ❖ Ausencia de crecimiento
- Crecimiento total

DISCUSIÓN:

De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 3 se puede deducir que el limite de tolerancia del extracto de semilla de toronja para esta bacteria es de 900µcg/ ml durante todo el periodo de incubación, no respondiendo de la misma manera a menores concentraciones; a diferencia de metil y propilparabeno donde los valores de tolerancia alcanzaron incluso los 600µcg/ml. Esto refleja que la efectividad del EST para *Salmonella* es a la concentración antes descrita.



Tabla 4. Resultados de valores de tolerancia expresados en $\mu\text{cg}/\text{ml}$

Concentración de extracto (EST) $\mu\text{cg}/\text{ml}$	<i>Staphylococcus. aureus</i>							
	Tiempo (hrs)							
	24	48	72	96	120	144	168	192
900	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
800	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
700	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
600	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
Concentración parabenos $\mu\text{cg}/\text{ml}$	Tiempo (hrs)							
	24	48	72	96	120	144	168	192
	900	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
800	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
700	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
600	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
Control (+)	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤

❖ Ausencia de crecimiento
➤ Crecimiento total.

DISCUSIÓN:

Si bien se observa en la tabla N° 4 los resultados obtenidos para *Staphylococcus.aureus* en cuanto al límite de tolerancia durante el tiempo de estudio fue de $600\mu\text{cg}/\text{ml}$ del extracto natural, valor obtenido de igual forma con conservadores tradicionales sintéticos de amplio uso como son propil y metil parabenos, lo que demuestra que para este microorganismo no hay diferencia entre el conservador natural y los conservador sintético a las concentraciones de estudio, siendo $600\mu\text{cg}/\text{ml}$ la concentración de eficacia del EST para *Staphylococcus.aureus*.



Tabla 5. Resultados de valores de tolerancia expresados en $\mu\text{cg}/\text{ml}$

Concentración de extracto (EST) $\mu\text{cg}/\text{ml}$	<i>Shiguella</i>							
	Tiempo (hrs)							
	24	48	72	96	120	144	168	192
900	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	➤
800	❖	❖	❖	❖	❖	❖	➤	➤
700	❖	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤
600	❖	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤
Concentración parabenos $\mu\text{cg}/\text{ml}$	Tiempo (hrs)							
	24	48	72	96	120	144	168	192
	900	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
800	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
700	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
600	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
Control (+)	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤

❖ Ausencia de crecimiento
 ➤ Crecimiento total

DISCUSIÓN:

Para la evaluación de la cepa de *Shiguella* se evidencia que para las concentraciones de estudio el límite de tolerancia alcanzado fue de $800\mu\text{cg}/\text{ml}$ únicamente para 144 horas (6 días), concentraciones inferiores no muestran efectividad contra el microorganismo en mención, lo que refleja la diferencia existente en comparación con los conservantes sintéticos de referencia.



Tabla 6. Resultados de valores de tolerancia expresados en $\mu\text{cg}/\text{ml}$

Concentración de extracto (EST) $\mu\text{cg}/\text{ml}$	<i>Echerichia.coli</i>							
	Tiempo (hrs)							
	24	48	72	96	120	144	168	192
900	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
800	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
700	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
600	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
Concentración parabenos $\mu\text{cg}/\text{ml}$	Tiempo (hrs)							
	24	48	72	96	120	144	168	192
	900	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
800	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
700	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
600	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
Control (+)	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤

❖ Ausencia de crecimiento
➤ Crecimiento total

DISCUSIÓN:

El caso de *Echerichia.coli* es similar al caso de *Staphylococcus.aureus* ya que en la tabla N° 6 se expresan resultados exactamente iguales, por lo cual el limite de tolerancia del ensayo obtenido para este microorganismo fue de $600\mu\text{cg}/\text{ml}$ del extracto, siendo esto corroborado con la respectiva comparación con los conservadores sintéticos de referencia.



Tabla 7. Resultados de valores de tolerancia expresados en $\mu\text{cg}/\text{ml}$

Concentración de extracto (EST) $\mu\text{cg}/\text{ml}$	<i>Candida. albicans</i>							
	Tiempo (hrs)							
	120	144	168	192	216	230	254	308
900	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
800	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤
700	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤
600	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤
Concentración parabenos $\mu\text{cg}/\text{ml}$	Tiempo (hrs)							
	120	144	168	192	216	230	254	308
	900	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
800	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
700	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
600	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖	❖
Control (+)	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤	➤

❖ Ausencia de crecimiento

➤ Crecimiento total

DISCUSIÓN:

Al evaluar la tolerancia de *Candida albicans* al extracto, se determinó que esta no puede ser menor de $900\mu\text{cg}/\text{ml}$, ya que a concentraciones inferiores a esta la inhibición de la levadura sería imposible, lo que indica que al comparar estos resultados no se ajustan a los estándares de referencia (metil y propilparabenos).



Tabla 8. Resultados del control de ambiente expresado en ufc/ ml

Control de ambiente					
Medios de cultivos	Tiempo (hrs.)				
	24	48	72	96	120
Caseína-Soja	2ufc/ml	3ufc/ml	4ufc/ml	6ufc/ml	7ufc/ml
Saboraud			6 ufc/ml	12 ufc/ml	18 ufc/ml

DISCUSIÓN:

Este tipo de control se realiza para determinar los tipos de microorganismos presentes en el ambiente a la hora de realizar el ensayo, para corroborar posteriormente la posible influencia de estos en los resultados obtenidos. De esta manera, los resultados descritos en la tabla NO8 nos indican que el número de microorganismos encontrados no representan necesariamente una influencia preponderante para nuestros resultados.



VII. CONCLUSIONES

Durante la realización de esta investigación se realizó la valoración de la efectividad antimicrobiana del extracto de semilla de toronja comercial a través de prueba *in vitro* que permitió corroborar lo descrito en la literatura, destacando así la importancia de estudios que comprueben la legitimidad de productos terminados, y de esta manera poder realizar la comparación con compuestos de referencia como metil y propilparabeno.

En base a los resultados obtenidos El presente estudio concluye que el extracto de semilla de toronja tiene actividad inhibitoria sobre cepas Gram positiva (*St.aureus*); Gram negativas (*E.coli*, *Salmonella*, *Shiguella*); y levaduras (*Candida albicans*), a una concentración de 1000µcg/ml, a intervalos de tiempo inclusive de 192 horas (8 días) para bacterias y 208 horas (12 días) totales para levaduras en comparación de respuesta con metil y propilparabeno, agentes de amplio espectro utilizados como referencia y controles para el presente estudio.

En base a los resultados obtenidos, constatamos que la actividad antimicrobiana del extracto de semilla de toronja a las concentraciones de tolerancia ensayadas muestran alta eficacia con las especies *E.coli* y *Staphylococcus aureus*, alcanzando límites de tolerancia de 600 µcg/ml a los intervalos de tiempo durante todo el período de incubación con respecto a conservadores tradicionales sintéticos donde se obtuvieron los mismos resultados, indicando que para dichos microorganismos no existe diferencia entre el conservador natural y los conservadores sintéticos; para las especies *Candida.albicans* y *Salmonella* se muestran limites de tolerancia que no difieren en gran medida a la concentración inicial de ensayo (1000 µcg/ml) siendo para estas de 900 µcg/ml; en contraste con los parabenos (metil y propil), para la especie *Shiguella* se encontraron limites de tolerancia del conservador de 800µcg/ml para intervalos de 144 horas (5 días inclusive), demostrando que la diferencia que existente entre ambos antimicrobianos no es de gran amplitud.

De manera general el conservador muestra eficacia en mayor medida para las especies *E.coli* y *Staphylococcus.aureus*, pero también tiene efectividad para las demás especies ensayadas aunque en un grado menor; basado a las concentraciones ensayadas y a los límites de tolerancia encontrados, se puede afirmar que se requieren de estudios científicos mas profundos para así poder determinar sus posibles aplicaciones en productos fitofarmacéuticos.



VIII. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados encontrados y al análisis realizado, considerando las condiciones actuales y potenciales de la necesidad de la industria fitoterápica de contar con agentes conservadores naturales, se proponen las siguientes recomendaciones:

1. Realizar estudios más detallados del extracto de semilla de toronja para poder establecer futuras aplicaciones.
2. Realizar la preparación del extracto de semilla de toronja (EST) puro sin coadyuvantes en su composición, para corroborar si presenta las mismas propiedades
3. comprobar la validez de los medios de cultivos para garantizar la obtención de resultados óptimos.
4. Garantizar los niveles mínimos de microorganismos presentes en el ambiente para evitar errores o alteraciones en el ensayo.
5. Establecer la efectividad del conservador natural en un producto terminado a fin de evaluar la correlación de las concentraciones ensayadas *in Vitro* con las concentraciones de efectividad del mismo.

Nota: todas estas recomendaciones se apoyan en los resultados de los ensayos a partir de un extracto de toronja que existe en el comercio.



IX. BIBLIOGRAFIA

Consultas en textos:

- Handbook of pharmaceutical excipients. Second Edition. Edited by: Ainley Wade and Paul, J. Woller. American pharmaceutical association. Washington 1994.
- Piura López, Julio. Introducción a la metodología de la investigación científica. Primera edición. Editorial el amanecer, S.A. Managua, Nicaragua, 1994. 114 Pág.
- USP N° 29. Np 24, edición anual en español. 2006. Tomo 3-4, Pág. 2718 (51). Pruebas microbiológicas para agentes conservadores.

Consultas en archivos [http://](#):

- Editorial QuimiNet. Listado de conservadores, colorantes y aditivos. Oficina Matriz México: México, Estados Unidos, Canadá, España, Centroamérica, Caribe, Resto del Mundo. Copyright © 2000 – 2009. Consultado en: Octubre, 2008. Disponible en: <http://www.quiminet.com.mx/ar6/ar.htm>
- Editorial QuimiNet. Listado de conservadores, colorantes y aditivos. Oficina Matriz México: México, Estados Unidos, Canadá, España, Centroamérica, Caribe, Resto del Mundo. Copyright © 2000 – 2009. Consultado en Octubre, 2008. Disponible en: <http://www.quiminet.com.mx/ar6/ar.htm>
- Macromèdica, boletines informativos. La toronja. Boletín del 14 de octubre del 2008. Consultado en Octubre, 2008. Disponible en: www.macromedica.com.mx/boletin/01/novedades.htm
- Martí, Esther y Belladona, Andrés. Foros Salud Natural. El Pomelo: Propiedades nutritivas y principios activos. Consultado en Agosto, 2008. Disponible en: www.casapia.com/paginacast/paginas/paginasdemenus/MenudeInformaciones/Complementos Nutricional/Extracto-semilla-Pomelo.htm



- Madigan M.T., Martinko J.M. y Parker J. (2004) Brock: Biología de los Microorganismos – 10ma Edición – ISBN: 84-205-3679-2. Consultado en Septiembre, 2008. Disponible en:
<http://search.conduit.com/Results.aspx?q=PRUEBAS+IMVIC+para+e.coli&meta=all&hl=es&gl=ni&SelfSearch=1&SearchSourceOrigin=1&ctid=CT1392740&octid=CT139274>
- Prescott L.M., Harley J.P. y Klein D.A. (2003) Microbiología – 4ta Edición – ISBN: 84-486-0261-7. Consultado en Noviembre, 2008. Disponible en:
<http://www.monografias.com/trabajos911/pruebas-bioquimicas/pruebas-bioquimicas.pdf>
- Universidad de Chile, Sede Antofagasta. Grupo de Microbiología y Parasitología. Departamento Ciencias de la Salud. Juan Silva, Nelson Herrera, Rodolfo Urdanivia, Mariana Jofre, Hernan Sagua. Determinación de la sensibilidad por CIM y método de difusión en placa de 13 antibióticos frente a 55 cepas de Salmonella Typhimurium. Consultado en Septiembre, 2008. Disponible en: www.scielo.cl/pdf/rcp/v50n4/art05.pdf
- Universidad de Chile, Sede Antofagasta. Grupo de Microbiología y Parasitología. Departamento Ciencias de la Salud. Juan Silva, Nelson Herrera, Rodolfo Urdanivia, Mariana Jofre, Hernan Sagua. Determinación de la sensibilidad por CIM y método de difusión en placa de 13 antibióticos frente a 55 cepas de Salmonella Typhimurium. Consultado en Septiembre, 2008. Disponible en: www.scielo.cl/pdf/rcp/v50n4/art05.pdf

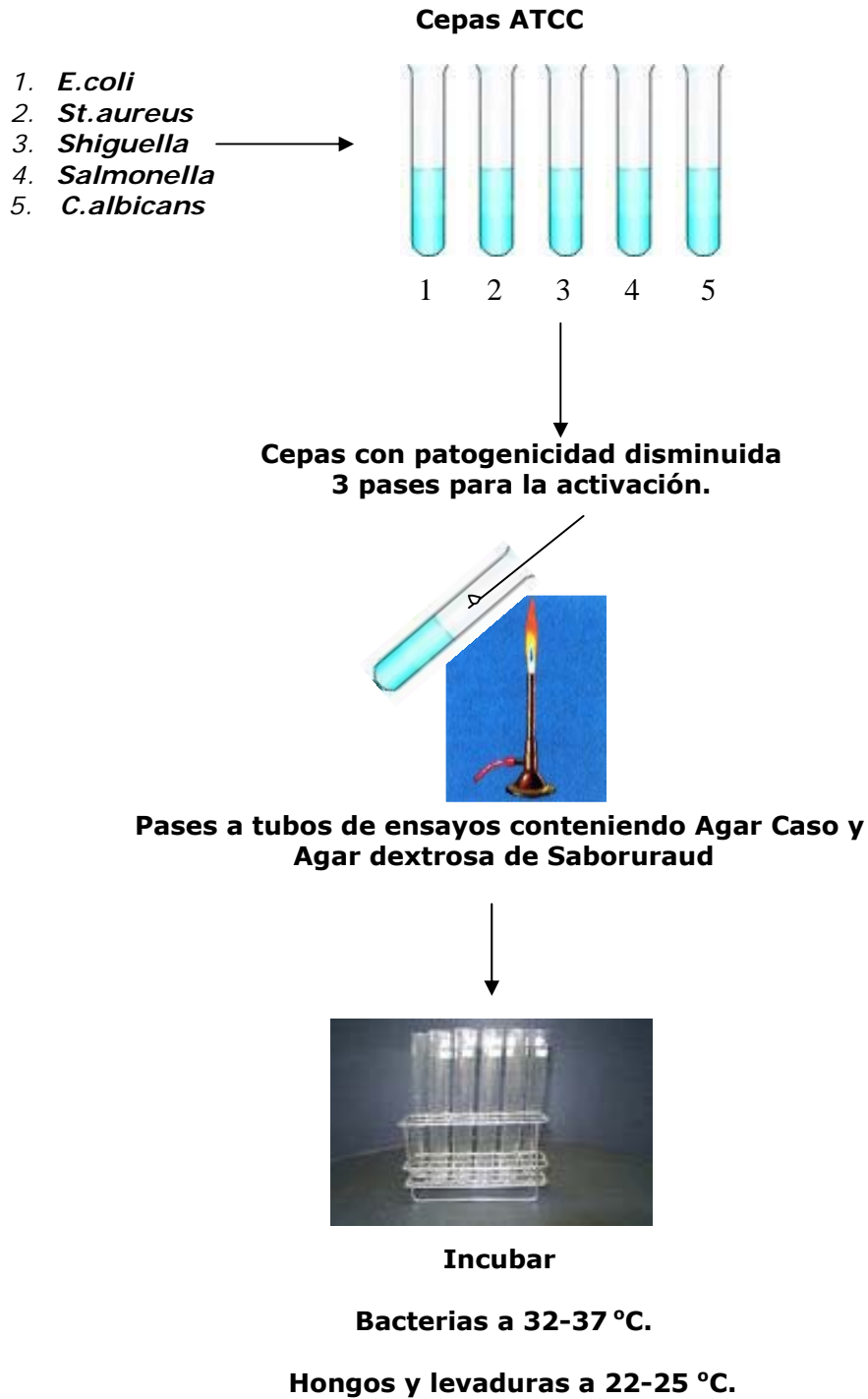


X. ANEXOS



ANEXO N° 1.

Esquema de ensayo de actividad antibacteriana a cultivos de microorganismos





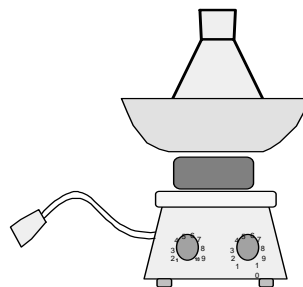
ANEXO N° 2

Preparación de los medios (agar caso y saboraud).

Pesar los gramos correspondientes por litro de solución.



Disolver con agua destilada en ebullición



Calentar hasta lograr solución clara



**Esterilizar
Autoclavando por 15 minutos a 121 °C.**





ANEXO N° 3

Preparación de la solución salina de cloruro de sodio 0.9%



Pesar 0.9 g de NaCl.



Disolver en 100 ml de agua destilada



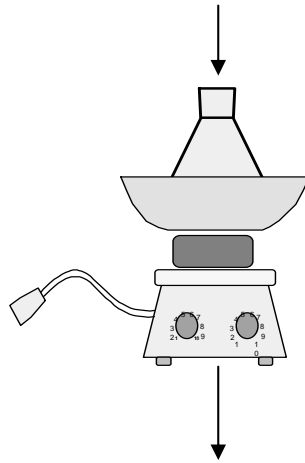
Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.



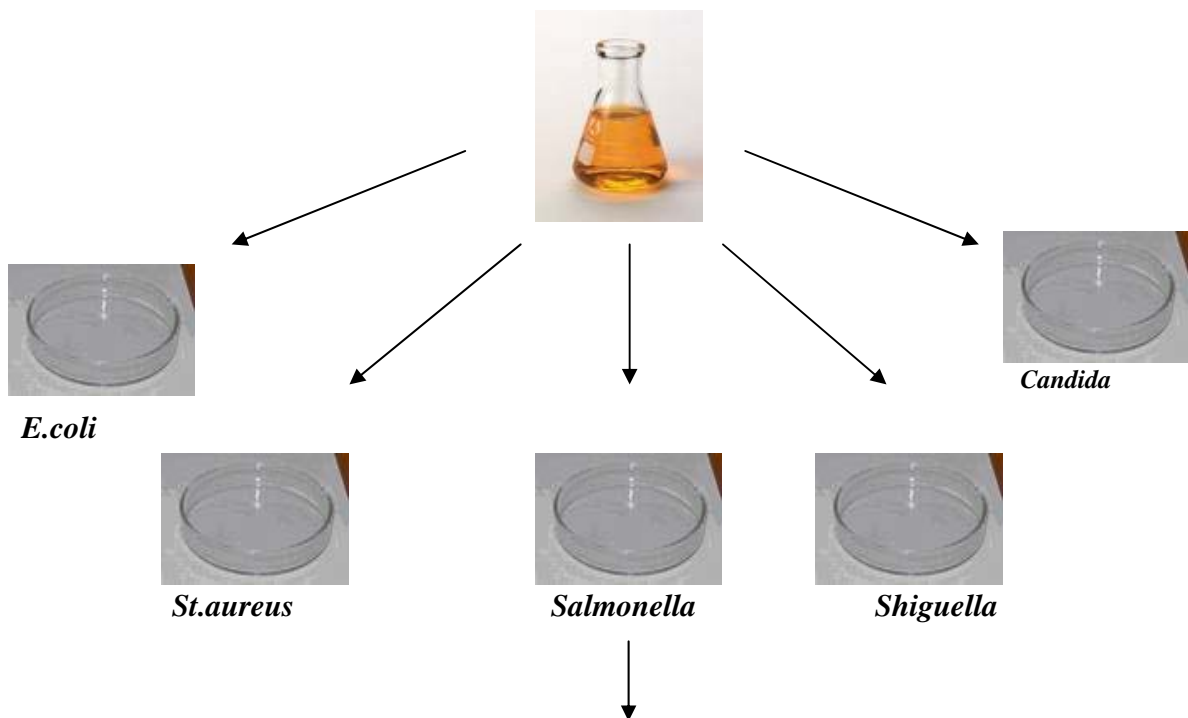
ANEXO N^o4

Preparación de los platos petri para el ensayo

Enfriar agar en baño María a 55°C
Previamente esterilizado en autoclave.



9ml agar + 0.1 muestra



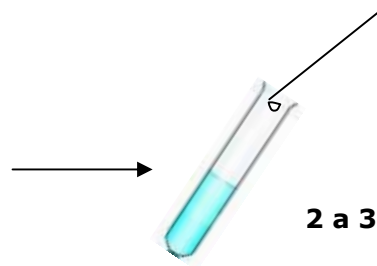
Homogenizar la mezcla y enfriar, encubando las placas de forma invertida a las temperaturas correspondientes para cada microorganismo.



ANEXO N° 5

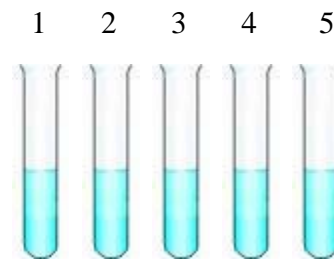
Preparación de la suspensión de microorganismos.

1. *E.coli*
2. *St.aureus*
3. *Shiguella*
4. *Salmonella*
5. *C.albicans*



2 a 3 asadas por cada m.o

Disolver en Solución salina 0.9%



Ajustar la suspensión



Agitar y homogenizar

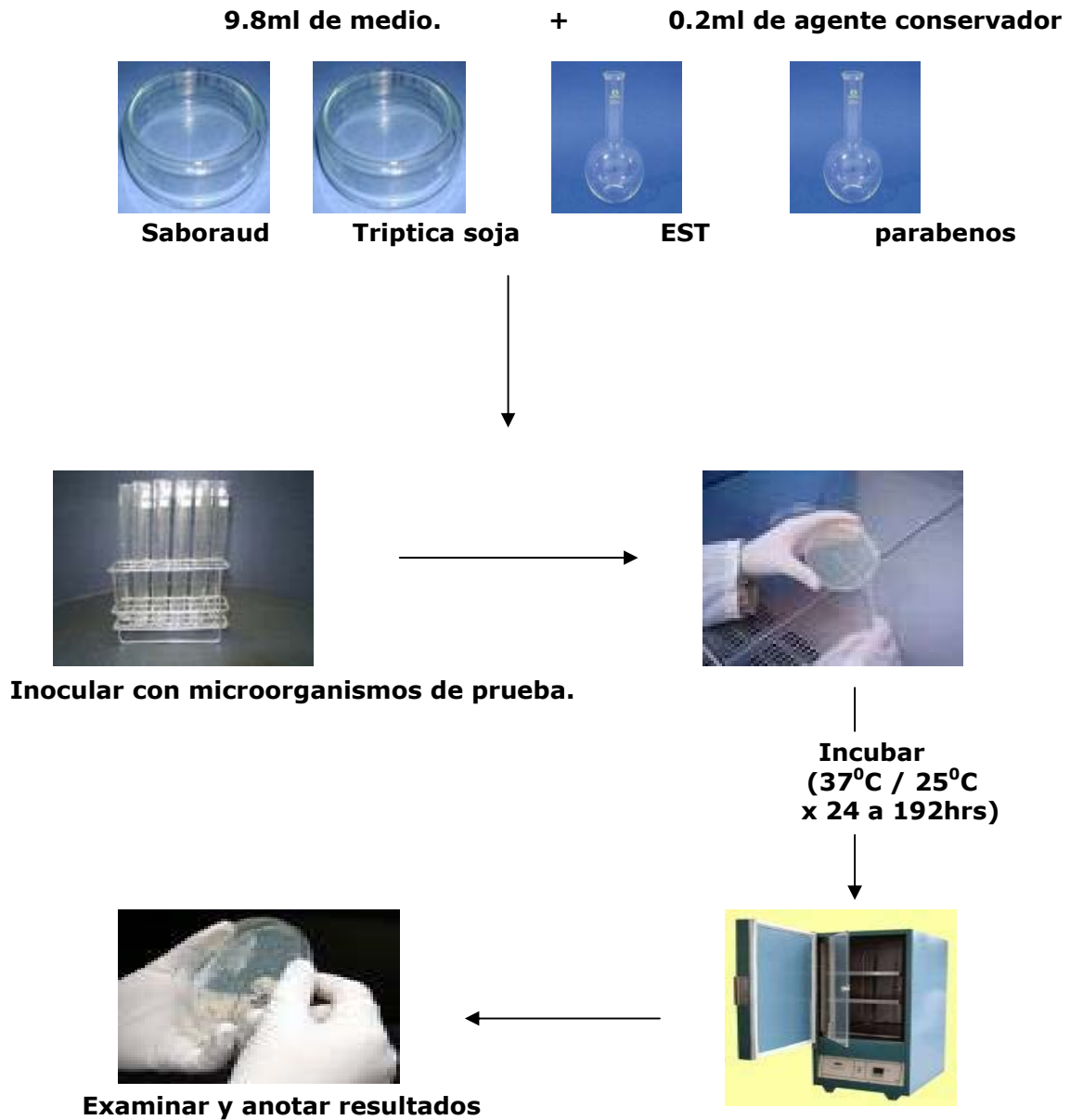


λ : 580nm y T: 25%



ANEXO N^o6

Rayado de microorganismos.





ANEXO N^o7

Preparación de parabenos

Pesar 1.5 gr de Metil y Propilparabeno



↓
Diluir en 30 ml de Glicerina



Reposar y homogenizar

↓
Concentración final 1000 µcg/ ml.

↓
Tomar 0.2 ml de esta solución. Depositar en los platos petri que contenga 9.8 ml. De medio respectivo para cada microorganismo.

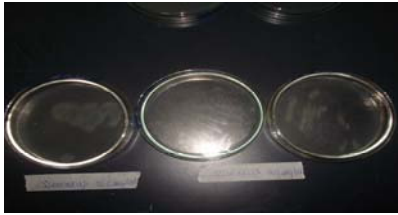


ANEXOS

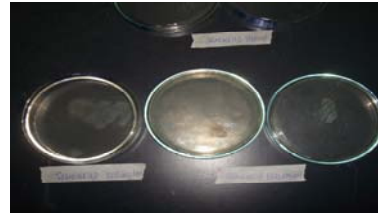
Fotos de las lecturas de límite de tolerancia de 600 a 900 $\mu\text{g/ml}$



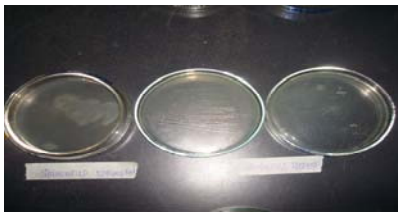
Salmonella 1000 - 900 $\mu\text{g/ml}$



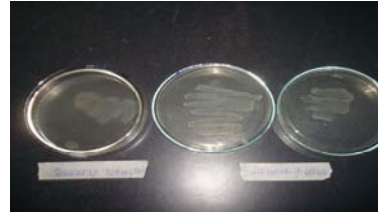
Salmonella 800 $\mu\text{g/ml}$



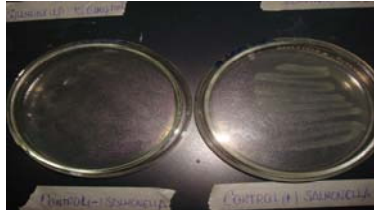
Salmonella 700 $\mu\text{g/ml}$



Salmonella 600 $\mu\text{g/ml}$



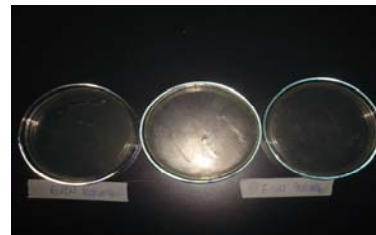
Control positivo y negativo



E.coli 1000 $\mu\text{g/ml}$



E.coli 900 $\mu\text{g/ml}$

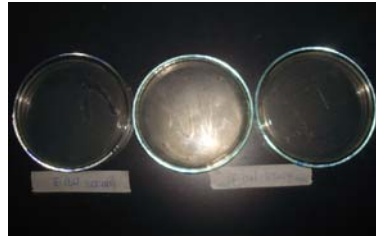




E.coli 800 $\mu\text{g/ml}$



E.coli 700 $\mu\text{g/ml}$



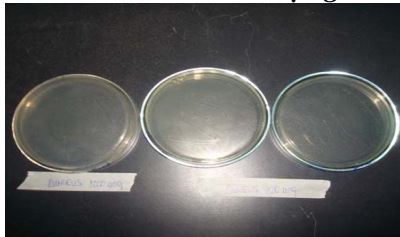
E.coli 600 $\mu\text{g/ml}$



Control positivo y negativo



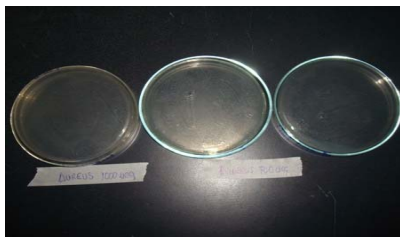
St.aureus 1000-900 $\mu\text{g/ml}$



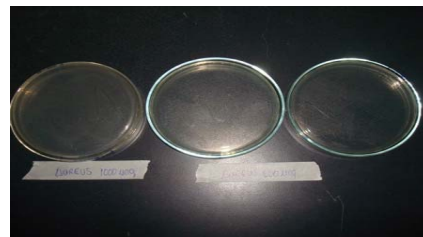
St.aureus 1000-800 $\mu\text{g/ml}$



St.aureus 1000-700 $\mu\text{g/ml}$



St.aureus 1000-600 $\mu\text{g/ml}$

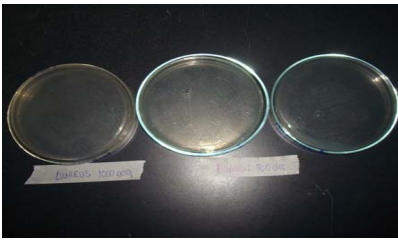


Control positivo y negativo

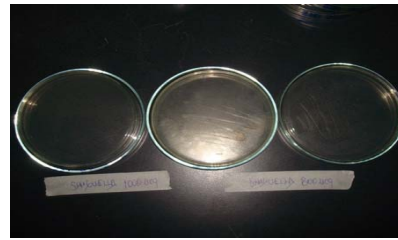




Shiguelia 1000-900 μ cg/ml



Shiguelia 1000-800 μ cg/ml



Shiguelia 1000-700 μ cg/ml



Shiguelia 1000-600 μ cg/ml



Control positivo y negativo



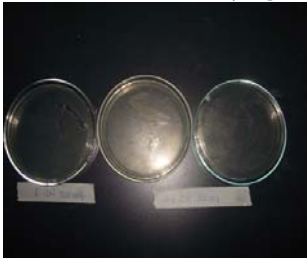
Candida 1000-900 μ cg/ml



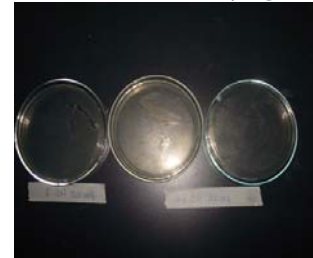
Candida 1000-800 μ cg/ml



Candida 1000-700 μ cg/ml



Candida 1000-600 μ cg/ml





Control negativo



Control positivo



Control de ambiente

*Control de ambiente
Saboraud*



*Control de ambiente
Caseina-Soja*

