

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA

UNAN- LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

CARRERA DE FARMACIA



Tesis para optar al Título de Licenciado Químico-Farmacéutico

Verificación de la Calidad Microbiológica de un Fitoterápico Mariguanol en gel comercializado en Chinandega, León, Estelí y Managua durante el periodo enero-octubre 2012

Autores:

Br. Jennifer Sánchez Narváez

Br. Karina Valverde López

Tutor: Lic. Kelvin Núñez

“2012 AÑO DEL BISENTENARIO Y REFUNDACION DE LA UNIVERSIDAD”

León, Nicaragua 2012



AGRADECIMIENTO

Agradecer a Dios por su bondad y misericordia, por regalarme la vida, la familia y los momentos que me llevaron a este momento.

A mis padres Raúl Valverde y Brenda López por la perseverancia y la fe que tienen, por dedicar su tiempo, cariño y comprensión.

A mi familia, mis hermanos David y Guillermo, mis abuelas Petrona López y Ernestina Reyes , a mis tíos en especial a mi tía Silvia por su cariño y sobre todo el ánimo que me brinda. A mis amigas que me brindan su comprensión y alegría.

A los docentes que han estado durante este tiempo pacientemente, a mi tutor por brindar sus conocimientos y tiempo, a las personas que me brindaron su apoyo para la realización de este estudio, en especial Don David Espinoza y Don Freddy Ríos.

Br. Karina Mercedes Valverde López.



DEDICATORIA

Dedico este nuevo logro a DIOS Padre, a la memoria de mi madre que siempre estuvo para mí por medio de sus consejos y amor.

A mi padre que dedica cada día a nuestra familia, a mis hermano, abuelas y a mi tía Silvia que han dedicado parte de su tiempo en los momentos más difíciles y felices de mi vida.

Br. Karina Mercedes Valverde López.



AGRADECIMIENTO

A JEHOVÁ DIOS PADRE por enseñarme lo valioso que es vivir en sus mandamientos, para ser la persona que Él desea, por tenerme bajo su protección y bendición, y permitirme terminar una etapa de mi vida y comienzo de otra.

A JESUS HIJO por ser el camino, la verdad y la vida, porque por medio de El tengo acceso al Padre, por sentir su presencia en mi vida.

A EL ESPIRITU SANTO DE DIOS por ser mi guía y El que me acompaña por el sendero de la vida, mostrándome día a día lo grande de su misericordia.

A mis Padres por ser mis motivadores y siempre están conmigo apoyándome.

A mis Abuelitos Sra. Vilma Paniagua y Sr. Ernesto Narváez, por su gran amor, apoyo y consejos.

A mi tutor y amigo por su tiempo y ayuda.

A una persona muy especial que Dios me envió y quiero mucho mi novio y amigo Joser Rico por transmitirme fortalezas, por su compañía, y amor incondicional.

A mis maestros por los conocimientos transmitidos en estos cinco años.

A mis amigos por su compañía y apoyo.

A Don David Espinoza y Don Freddy Ríos por su ayuda y disposición.

Br. Jennifer Ellieth Sánchez Narváez



DEDICATORIA

A **JEHOVÁ DIOS** por la vida, el amor y fortaleza que me da para seguir adelante, sin importar las dificultades, siempre está a mi lado; dándome fuerzas y bendiciones para terminar esta carrera universitaria.

A **JESUS HIJO** por ser mi amigo fiel, mi ejemplo a seguir.

Al **ESPIRITU SANTO DE DIOS** por infundirme aliento en los momentos difíciles y darme tanta confianza y felicidad.

A mi Madre Lic. Yolanda Narváez, por ser una madre maravillosa, a quien admiro mucho por ser una mujer emprendedora y darme su amor y apoyo incondicional.

A mi Padre Sr. Marcos Sánchez, por darme su apoyo y amor incondicional.

A mi Amigo y tutor Lic. Kelvin Núñez, por ser mi maestro y guía en todos los sentidos, por su amistad incondicional y enseñanzas transmitidas.

A mi novio Joser Rico, por ser mi ayuda idónea en la realización de este trabajo y por su amor incondicional.

A mis Hermanos Kevin y Kendra Sánchez por ser bendiciones en mi vida.

Br. Jennifer Ellieth Sánchez Narváez



Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Marco Teórico.....	4
3.1. Producto natural medicinal	
3.2 Drogas crudas	
3.3 Calidad de las drogas crudas	
3.4 Factores que influyen en la calidad de las drogas crudas	
3.5 Control de calidad	
3.6 Control de calidad de drogas naturales	
3.7 Control de calidad de plantas medicinales	
3.7.1 Prescripciones Farmacopeicas	
3.7.2 Principales problemas detectados en el control de calidad	
3.8 Control de calidad de productos fitoterapeúticos	
3.8.1 Límites y especificaciones generales para drogas naturales	
3.9 Verificación de la calidad de productos naturales según el reglamento técnico centroamericano	
3.9.1 Evaluación técnica	
3.9.2 Pruebas	
3.9.3 Características organolépticas	
3.10 Geles	
3.10.1 Clasificación	
3.10.2 Estabilidad de geles	
3.10.3 Definición Farmacotécnica	
3.10.4 Ventajas y desventajas de los geles	
3.10.5 Mecanismo de formación de un gel	
3.11 Análisis microbiológico	
3.11.1 Prueba de límite microbiano	
3.11.2 Muestreo	
3.11.3 Procedimiento	
3.11.4 Método de recuento de microorganismos	
3.11.5 Valoración	
3.11.6 Medio de cultivo	
3.12 Recuento microbiano	
3.12.1 Técnicas de recuento	
4. Hipótesis.....	25
5. Material y método.....	26
6. Resultados y Análisis de los resultados.....	34
7. Conclusión.....	42
8. Recomendaciones.....	43
9. Referencias Bibliográficas.....	44
10. Anexos.....	47



1. INTRODUCCION

El uso de plantas con fines terapéuticos ha evolucionado elaborándose diversas formas farmacéuticas. La mayoría de ellas presentan efectos fisiológicos por la presencia de uno o más principios activos que se encuentran sometidos a variaciones físicas. La OMS (Organización Mundial de la Salud) ha establecido que "una planta medicinal es un vegetal que contiene sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o síntesis químico-farmacéutica cuya acción farmacológica depende de la combinación de los principios activos denominándose fitofármacos".¹

La mayoría de los fitofármacos no cuentan con un registro sanitario o una base científica que garantice la inocuidad, efectividad así como análisis físico-químicos o microbiológicos que verifiquen la calidad de las materias primas y de los productos terminados. Con el objetivo de regular la producción y comercialización de productos naturales fue aprobado como Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 11.03.56:09, Productos Farmacéuticos. Productos Naturales Medicinales para uso Humano. Verificación de la Calidad que establece las pruebas analíticas que deben ser realizadas para verificar la calidad de los productos naturales medicinales de uso humano.²

En Noviembre del 2011 fue presentado en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-León "Verificación de la calidad de un producto Fitoterápico en cápsulas comercializado en los Departamentos de Managua, Estelí y León, durante el periodo comprendido entre Octubre 2010–Octubre 2011". Dicha investigación reveló, que de acuerdo a la composición química de las plantas contenidas en su marbete y el contenido fitoquímico entre las muestras difirió entre sí y no corresponden a la composición química documentada.³

En octubre del 2011 se presentó en la misma Alma mater, una "Evaluación de la calidad microbiológica de té comercializado en supermercados de la ciudad de León". Donde se evaluó cuantitativamente la calidad microbiológica de los diferentes tipos de té y se identificó los principales microorganismos presentes.⁴



En los mercados populares y centros botánicos se comercializa un producto Mariguanol en diversas presentaciones semisólidas (cremas , ungüentos , gel)de origen desconocido, que supone estar hecho con extracto de marihuana; pese a que según las autoridades su comercialización es ilegal por no contar con Registro Sanitario; su demanda se incrementa cada día, por atribuirse propiedades analgésicas.

El presente trabajo investigativo está basado justamente en la realización de un ensayo microbiológico, que nos permitió verificar la calidad del producto Fitoterápico llamado Mariguanol y evaluar si cumple con las especificaciones del RTCA vigente de acuerdo a lo declarado en su marbete, con el propósito de brindar información sobre la calidad microbiológica de dicho producto fitoterapéutico que es ofertado sin registro sanitario y es consumido por gran parte de la población.



2. OBJETIVOS

General

- Verificación de la calidad microbiológica de un producto Fitoterápico en Gel Mariguanol mediante ensayo de Límite Microbiano según actual Reglamento de Verificación de la Calidad de Productos Naturales R.T.C.A. 11.03.56:09

Específicos

- Determinación del contenido de Bacterias Aerobias Mesófilas según actual Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 11.03.56:09
- Determinación del contenido de hongos y levaduras según actual Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 11.03.56:09 en las muestras a ensayar obtenidas de diferentes departamentos.
- Verificación del contenido de bacterias patógenas en muestras aisladas de resiembra según actual Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 11.03.56:09
- Valoración microscópica de material vegetal aislado en muestras de ensayo



3. MARCO TEÓRICO

4.1 PRODUCTO NATURAL MEDICINAL₅

Producto procesado, industrializado y etiquetado con propiedades medicinales, que contiene en su formulación ingredientes obtenidos de las plantas, animales, minerales o mezclas de éstos. Puede contener excipientes además del material natural. Los productos naturales medicinales a los que se les adicionen sustancias activas de síntesis química o aislada de material natural como responsables de la actividad farmacológica, no son considerados como productos naturales medicinales.⁵

4.2 DROGAS CRUDAS₅

Son las drogas vegetales o animales que han recibido sólo el proceso de recolección y secado para estar en condiciones de ser almacenadas.⁵

4.3 CALIDAD DE LAS DROGAS CRUDAS₅

La calidad de las drogas crudas depende de numerosos factores que hacen variar el contenido de constituyentes lo que incide en la calidad del producto terminado. Por ello, la calidad del producto final no puede ser asegurada sin el uso de una droga cruda de buena calidad, independientemente de cuan especial es su proceso de manufactura.⁵

Las drogas vegetales requieren el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura, donde la documentación de los tratamientos realizados a la planta medicinal, desde su lugar de origen hasta su manufactura, constituyen una obligación.⁵

4.4 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DE LAS DROGAS CRUDAS₅

- Factores genéticos
- Estado de desarrollo
- Factores climáticos
- Factores nutricionales
- Fuente de obtención



- Tratamientos post-colecta o post-cosecha
- Almacenamiento.

4.5 CONTROL DE CALIDAD₅

Uno de los pasos imprescindibles que debe efectuarse previamente a su utilización en un proceso de elaboración industrial o magistral de medicamentos. Su realización responde a la necesidad de asegurar su identidad, de garantizar su pureza, es decir de descubrir eventuales adulteraciones, falsificaciones o contaminaciones, de certificar su estado de conservación y de identificar y valorar su contenido en principios activos, los cuales son, en definitiva, los responsables de su acción farmacológica y los que le confieren valor terapéutico.⁵

1. Análisis de materia prima (Droga Cruda y Material semiprocado -Extractos)
2. Producto Terminado.

4.6 CONTROL DE CALIDAD DE DROGAS NATURALES₅

Tiene como objetivos cumplir con los parámetros que aseguren la calidad de la materia prima natural.

1. Identificación₅

- Autenticación botánica (macro y micromorfología) y organoléptica
- Identificación física, química o física/química (fluorescencia, histoquímica, ensayos fitoquímicos, cromatografía)

2. Pureza₅

- Materia extraña
- Humedad
- Cenizas totales y ácido-insolubles
- Contaminación microbiana
- Aflatoxinas
- Residuos de pesticidas
- Determinación de metales pesados



- Contaminación radioactiva

3. Potencias

- Índice de amargo
- Índice de pungencia
- Índice de hinchamiento
- Índice de espuma
- Índice hemolítico
- Materia extractiva
- Determinación de grupos químicos:
 - Aceites esenciales
 - Taninos
 - Alcaloides totales
 - Antraquinonas, etc.

4.7 CONTROL DE CALIDAD DE PLANTAS MEDICINALES₆

4.7.1 PRESCRIPCIONES FARMACOPEICAS₆

Las farmacopeas son códigos oficiales adoptados en donde son descritos los patrones de calidad de los medicamentos y los métodos para su análisis.₆

Aunque las disposiciones legales que rigen su aplicación difieran de país a país el objetivo final es hacer que el producto ofrecido como sustancia medicamentosa, satisfaga un patrón de calidad enmarcado en las exigencias de la monografía, cuando sea sometido a un análisis utilizando los métodos preconizados por la farmacopea.₆



Considerando la creciente participación de las plantas medicinales y medicamentos de origen vegetal, se hace necesario efectuar el control de calidad a través de técnicas modernas. Las plantas medicinales que constituyen la materia prima para la elaboración de productos fitoterapéuticos poseen variaciones en el contenido de su principio activo y pueden sufrir deterioro o contaminación. Por esta razón el control de calidad de las materias primas vegetales es de particular importancia.⁶

4.7.2 PRINCIPALES PROBLEMAS DETECTADOS EN EL CONTROL DE CALIDAD⁶

- La droga utilizada no está descrita en la farmacopea y puede presentarse una sustitución, una falsificación o una sofisticación⁶:

Adulteración de la materia prima vegetal, las sustituciones son frecuentemente justificadas debido a la dificultad de obtener la especie farmacopeica. Las falsificaciones son burdas adulteraciones y en general ocurren en la recolección de las plantas nativas. Existen dos tipos de sustitución realizados por mayoristas y fabricantes sin escrúpulos en la utilización de plantas de valor económico menor y acción farmacológica no comprobada.⁶

Las sofisticaciones son de difícil detección y se presentan principalmente en extractos y tinturas, incluso drogas extraídas exhaustivamente. Consiste en adicionar a la droga extraída sustancias naturales aisladas o sustancias sintéticas de estructuras semejantes a los principios activos que están contenidos originalmente en la planta.

- La parte de la planta no corresponde a la prescrita⁶:

Los principios activos no se distribuyen uniformemente por toda la planta; 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.⁶



- La cantidad de “sustancias extrañas” es superior a la permitida₆:

La definición farmacopeica de sustancias extrañas comprende: plantas diferentes de las descritas, partes de la misma planta diferentes de la parte descrita y otras materias extrañas. Algunas veces la monografía farmacopeica establece un límite para partes de la planta diferente de la descrita.₆

- El contenido de ceniza es superior al permitido₆:

Las cenizas resultantes de la incineración del material vegetal pueden ser fisiológicas y no fisiológicas. Se denomina ceniza fisiológica aquella derivada de los componentes minerales de la propia planta. La que se deriva de materia extraña se denomina ceniza no fisiológica; indica generalmente un procedimiento de recolección y almacenamiento inadecuado.₆

- El contenido de componentes activos no corresponde al prescrito₆:

Indica baja calidad de la materia prima vegetal, cuando se trata de la utilización de la droga vegetal para el aislamiento de sustancias vegetales 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.₆

- Contaminación microbiológica₆:

La contaminación microbiana envuelve serios riesgos para los usuarios, debido a que puede abarcar la contaminación por gérmenes patógenos, endotoxinas bacterianas, mico toxinas y transformaciones microbianas de los constituyentes botánicos y compuestos tóxicos.₆

- Contenido de pesticidas y contenidos de metales pesados superior al permitido₆:

El aumento de la contaminación ambiental debido a los metales tóxicos y el uso indebido de los pesticidas a ocasionado un aumento de numero de muestras que presentan residuos superiores a los limites admitidos.₆



4.8 CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FITOTERAPEUTICOS₆

Cuando se llevan a cabo las investigaciones para buscar o confirmar una actividad farmacológica es muy importante la determinación de los constituyentes químicos de la planta. Las sustancias presentes en el extracto deben ser evaluadas químicamente, pues de lo contrario el experimento puede ser inválido por no utilizar un extracto estandarizado, ya que para que los resultados sean reproducibles, los ensayos deben ser realizados con plantas que tengan una misma proporción de sus constituyentes. ₆

La cromatografía es un método físico que permite la separación de mezclas de sustancias en sus componentes individuales. Esta técnica permite igualmente obtener informaciones cuantitativas y cualitativas sobre las sustancias presentes en las muestras. La técnica cromatográfica aumenta la eficiencia en el análisis de productos fitoterapéuticos. ₆

Una vez identificado el material vegetal que va a ser utilizado el siguiente paso consiste en establecer los análisis cuantitativos y cualitativos. El análisis cualitativo se constituye por definición como la huella digital de los componentes. Incluso si las sustancias activas no son conocidas, el cromatograma de la planta presenta una especie de diseño único en el cual la proporción de sus componentes deben ser homogéneas o variar en escalas bastante estrechas. Si una sustancia activa es conocida se puede obtener resultados cuantitativos siempre y cuando se disponga un patrón puro de ella. ₆

Para seleccionar la mejor técnica cromatográfica para el análisis de una determinada planta, es necesario evaluar los límites de detección, la complejidad de los extractos y la estructura química de las sustancias que van a ser analizadas. ₆



4.8.1 LÍMITES Y ESPECIFICACIONES GENERALES PARA DROGAS NATURALES₆:

Tabla 1. ESPECIFICACIONES FISICOQUÍMICAS₆:

Contenido de agua (en drogas secas)	< 12%
Contenido de materia extraña (droga seca)	< 2%
Arsénico	< 2 ppm
Metales pesados	Plomo: <10 ppm Cadmio: < 0.3 ppm

4.8.2 Tabla 2. LÍMITES MICROBIANOS PARA DROGAS NATURALES₆:

Expresados en UFC/g o cm³

Recuento total de Aerobios viales	No especifico
Recuento de propagulos de mohos	$\leq 10^5$
<i>Escherichia coli</i>	$\leq 10^4$
<i>Salmonella</i>	Ausente

4.9 VERIFICACIÓN DE LA CALIDAD DE PRODUCTOS NATURALES SEGÚN EL REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO.⁷

- RTCA 11.03.56:09, productos naturales medicinales para uso humano. Verificación de la calidad. ¹⁵
- RTCA (sin número), definido como documento “Para Registro Sanitario”. ⁷

4.9.1 EVALUACIÓN TÉCNICA⁷

Etiquetado⁷

Debe cumplir con el RTCA 11.04.41:06 Productos Naturales de uso Humano. Productos Naturales con propiedades Medicinales. Etiquetado de los Productos Naturales.



4.9.2 PRUEBAS₇

Tabla 3. Pruebas físicas, químicas y microbiológicas₇

Forma farmacéutica	Pruebas
Cremas, Ungüentos y Geles	Características organolépticas Llenado mínimo * pH Identificación general o específica Recuento microbiano

Notas:

- Las pruebas a las que se refiere la tabla N° 1 se ejecutarán cuando apliquen de acuerdo a las monografías oficiales, o en su defecto a las aportadas por el fabricante.₇
- Las especificaciones de las pruebas físicas y químicas mencionadas en la Tabla N° 1 serán tomadas de los libros oficiales o de la literatura técnica reconocida, o en su defecto las que establezca el fabricante.₇
- (*) Las pruebas indicadas con asterisco serán realizadas a los productos naturales por vigilancia sanitaria o denuncia recibida₇

Tabla 4. Especificaciones para determinación de recuento microbiano₇

Expresados en UFC/g o cm³

Producto natural	Recuento total de aerobios viables	Recuento total de hongos y levaduras	Recuento total de Enterobacterias
Preparaciones de administración tópica	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^1$



Tabla 5. Especificaciones para determinación de microorganismos patógenos⁷

Expresados en UFC/g o cm³

Producto natural	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella spp.</i>
Preparaciones de administración tópica	Ausente	-----	Ausente	-----

Tabla 6. Cantidad de muestras requeridas para la verificación de la calidad de los productos naturales medicinales⁷

Producto	Cantidad (unidades)		
	Muestra	Muestra de retención/ contra muestra	Total de muestras
Cremas, geles y ungüentos mayores de 30 g	10	10	20
Cremas, geles y ungüentos menores de 30 g	15	15	30

Nota:

Para la identificación de ciertos componentes naturales es posible que se requiera una mayor cantidad de muestra para lograr determinar la presencia de ciertos componentes, debido a que, generalmente, éstos se encuentran en pequeñas cantidades en los productos naturales medicinales, por lo tanto, la autoridad reguladora se reserva el derecho de solicitar mayor cantidad de muestras para efectos de análisis.⁷



4.9.3 Características organolépticas ⁷

- Olor
- Color
- Textura
- Determinación de pH
- Área de extensibilidad: El rango se establece en dependencia del producto
- Viscosidad: Da información de la consistencia del producto
- Análisis Reológico

4.10 GELES

Se denominan geles a coloides transparentes. Sistema de dos componentes, rico en líquido, de naturaleza semisólida. Debido a que las partículas brownianas están cargadas eléctricamente, hay interacción entre ellas. Esto da lugar a que formen una estructura regular, lo que les da una consistencia que no es la rígida de un cristal, pero tampoco la de fluido que corresponde al líquido. La característica común de los geles es la presencia de un tipo de estructura continua que les proporciona las propiedades de los semisólidos.⁸

4.10.1 CLASIFICACIÓN⁸

- Dependiendo de su comportamiento frente al agua
- Según el número de fases en que están constituidas
- Clasificación de los geles por su viscosidad
- Clasificación de los geles por su estructura
- Clasificación en función del origen y / o naturaleza de los polímeros
- En función de la naturaleza de la fase interna



DEPENDIENDO DE SU COMPORTAMIENTO FRENTE AL AGUA

- **Geles hidrófilos o hidrogeles:** constituidos por agua, glicerina, propilenglicol u otros líquidos hidrofílicos. Gelificados por sustancias de tipo poliméricas, goma tragacanto, almidón, derivados de la celulosa, polímeros carboxílicos o silicatos de aluminio y magnesio.⁸
- **Geles hidrófobos o lipogeles (oleo geles):** constituidos por parafina líquida adicionada de polietileno o por aceites grasos gelificados por anhídrido silícico coloidal o por jabones de aluminio y zinc.⁸
 - Los lipogeles son vehículos oleosos oclusivos, de muy diversa consistencia, que los hace aptos para el tratamiento de dermatosis crónica, por su acción emoliente-lubricante. Estos vehículos son de elección debido a su inercia química, especialmente utilizados en los preparados oftálmicos, ya que los principios activos por sus características intrínsecas producen en el paciente un excesivo reflejo de lagrimeo, lo que lleva a un tiempo de permanencia muy corto en el lugar de aplicación. La formulación en el seno de un excipiente oleoso permite solventar este hecho.⁹
 - A las bases hidrocarbonadas se les puede adicionar sustancias como ceras, lanolina, derivados de la lanolina y alcoholes grasos (cetílico y cetoestéarílico).⁹

SEGÚN EL NÚMERO DE FASES EN QUE ESTÁN CONSTITUIDAS

- **Geles monofásicos:** el medio líquido lo constituye una sola fase o líquidos miscibles; agua-alcohol, solución hidroalcohólica, aceite, etc.¹⁰
- **Geles bifásicos:** constituidos por dos fases líquidas inmiscibles, formándose una estructura transparente con propiedades de semisólido.¹⁰



Los geles bifásicos se subdividen en dos grupos:

- Los TOW gels
- Los TAS gels

En los **TOW gels** el lípido se incorpora a la micela que forma el emulgente, el cual se comporta como agente solubilizante. Los TOW gels son geles bifásicos micelares O/W; se presentan en forma de un sistema de cristales líquidos, transparentes, y viscosos. Son sonoros o vibrantes a la percusión, también se les denomina con el nombre de ringing gels. A estos geles se les puede incorporar sustancias tanto lipo como hidrosolubles.¹¹

Esta formulación es simple en cuanto a ejecución y comprende:¹¹

- ◇ Uno o más emulgentes hidrófilos de elevado HLB, capaz de formar micelas.
- ◇ Un cosolvente que facilita la micelación del líquido.
- ◇ Un lípido fluido.
- ◇ Agua.

Los **TAS gels** son geles transparentes basados en emulsiones de siliconas W / S (agua / silicona). Se consideran como una crema transparente de agua en siliconas, de gran aplicación cosmética.¹¹

Modus operandi: Mezclar la fase acuosa sobre la fase oleosa lentamente y con agitación. Se elaboran en frío.¹¹

A esta formulación pueden incorporarse diversas sustancias como clorhidrato de aluminio, filtros solares. Se aplican cuando hay que formular geles hidrorrepelentes¹¹



CLASIFICACIÓN DE LOS GELES POR SU VISCOSIDAD¹²

- Geles fluidos
- Geles semisólidos
- Geles sólidos (formulación de los sticks desodorantes y colonias sólidas)

Clasificación de los geles por su Estructura¹³

- **Geles elásticos**

Un gel típico elástico es el de gelatina, se obtiene por enfriamiento del sol liófilo que resulta cuando se calienta esta sustancia con agua. Otros soles dan geles elásticos, por ejemplo: agar, almidón, pectina, siempre que no sean demasiado diluidos. El gel elástico por hidratación se regenera. Cuando un gel elástico ha tomado mucho líquido, por ejemplo agua, de la fase vapor, todavía puede adsorber cantidades considerables cuando se lo coloca en el líquido, aumentando notablemente el volumen del gel; este fenómeno se llama imbibición o hinchamiento o swelling. ¹³

- **Geles no elástico**

El gel no elástico más conocido es el del ácido silícico o gel de sílice. Se obtiene mezclando soluciones de silicato de sodio con ácido clorhídrico en concentraciones apropiadas. Un gel no elástico (sílice) se hace vítreo o se pulveriza y pierde su elasticidad por secado.

Los geles no elásticos no tienen imbibición o hinchamiento, pueden tomar líquido sin cambio de volumen. ¹³



EN FUNCIÓN DE LA NATURALEZA DE LA FASE INTERNA¹⁴

- Inorgánicos: como el magma de bentonita.

- Orgánicos:
 - Naturales: como la goma arábica y la gelatina
 - Sintéticos: como la carboximetilcelulosa sódica e Hidroxipropilcelulosa

4.10.2 Estabilidad de Geles¹⁴

Los factores desencadenantes de la inestabilidad de un gel son:

- Temperatura
- Cambios de pH
- Agitación violenta
- Electrólitos

4.10.3 DEFINICIÓN FARMACOTÉCNICA¹⁴

Los geles son formas farmacéuticas de consistencia semirrígida, generalmente no tienen aceites grasos, destinados a aplicarse sobre las membranas mucosas, no tienen poder de penetración, por eso se utilizan para ejercer acción tópica (de superficie).¹⁴

4.10.4 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS GELES¹⁴

Ventajas

- Son bien tolerados
- Fácilmente lavables
- Producen frescor



Desventajas

- Incompatibilidad con numerosos principios activos
- Tendencia a la desecación
- Bajo poder de penetración (indicados para tratamientos superficiales)

4.10.5 MECANISMO DE FORMACIÓN DE UN GEL¹⁵

Los productos gelificantes se pueden agrupar del siguiente modo:

- Polímeros que dan lugar a un gel dependiente del pH del medio.
- Polímeros que dan lugar a un gel por sí mismo, independiente del pH del medio.¹²

Los primeros dan lugar a soluciones ácidas que al neutralizar con las bases adecuadas, aumentan la viscosidad y disminuyen la turbidez del medio. El mecanismo por el cual se forma el gel es el siguiente: a bajos valores de pH, se disocia una pequeña proporción de grupos carboxílicos del polímero, formando una espiral flexible.

La adición de una base produce la disociación de grupos carboxílicos, ionizándose, creando repulsión electrostática entre las regiones cargadas, expandiéndose la molécula, haciendo más rígido el sistema, gelificándolo. Se pasa de una estructura espiralada a una desenrollada o extendida, ejemplo Carbomer. Si se agrega un exceso de base puede producir una pérdida de viscosidad al neutralizarse los grupos carboxílicos. El agregado de electrólitos a estos geles, como por ejemplo cloruro de sodio, disminuye la viscosidad, ya que los grupos carboxílicos cargados se rodean de cationes metálicos, produciéndose una neutralización de cargas, impidiendo la formación de una matriz rígida. ¹⁵

Los segundos no precisan ser neutralizados para la formación del gel, gelifican por sí mismo, forman puentes de hidrógeno entre el solvente y los grupos carboxílicos del polímero.¹⁵



Merecen especial mención dentro de este tipo de preparados los denominados Plastibases (N.R.), vehículos de consistencia de gel y reología plástica. ¹⁵

4.11 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

4.11.1 PRUEBA DE LÍMITE MICROBIANO¹⁶

Este procedimiento se aplica a materias primas, productos en proceso y productos terminados. Estas muestras pueden ser medicamentos, fitofármacos, cosméticos, alimentos procesados y otros. Lo que varía son las especificaciones dependiendo del tipo de muestra que se analiza. Esta prueba es utilizada para estimar el número de microorganismos aerobios viables, hongos y levadura presentes y para determinar la ausencia de especies microbianas patógenas en productos medicinales.¹⁶

RECOMENDACIONES GENERALES¹⁶

- Durante la preparación y la realización de las pruebas, deben tomarse las precauciones asépticas necesarias para la manipulación de las muestras.
- A menos que se indique algo diferente, cuando el procedimiento especifique simplemente incubar, mantener el envase en el aire que este termostáticamente controlado a una temperatura entre 30°C y 35°C, durante un periodo de 24 a 48 horas.
- El tiempo transcurrido desde la preparación de la primera dilución hasta su incorporación con el medio de cultivo no debe exceder de una hora.

El termino crecimiento se usa aquí con un sentido especial, es decir, para designar la presencia y supuesta proliferación de microorganismos viables.¹⁶



PRUEBAS PREPARATORIAS₁₆

La validez de los resultados de las pruebas que se describen depende, en gran medida, de que pueda demostrarse de manera adecuada que las muestras a las que se aplican no inhiben, por sí solas, la multiplicación, bajo las condiciones de la prueba, de los microorganismos que pudieran estar presentes.¹⁶

Antes de realizar una prueba de manera periódica y según las circunstancias lo exijan posteriormente, las muestras diluidas del material que se desea analizar se deben inocular con cultivos viables de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* separados.¹⁶

Esto se puede lograr agregando 1 mL de una dilución de no menos de 10^{-3} de un caldo de cultivo de 24 horas del microorganismo a la primera dilución (en Solución Amortiguadora de Fosfato de pH 7,2, Medio Líquido de Digerido de Caseína y Soja, o Medio Líquido de Lactosa) del material de prueba y siguiendo el procedimiento de prueba.

Si el o los microorganismos no crecen en el medio utilizado, queda invalidada esa parte del análisis y debe modificarse el procedimiento, ya sea:

- Mediante un aumento en el volumen de diluyente, manteniendo la misma cantidad de material de prueba.
- Mediante la incorporación de una cantidad suficiente de agentes inactivantes adecuados en los diluyentes.
- Mediante una combinación apropiada de las modificaciones indicadas anteriormente para permitir el crecimiento de los inóculos.¹⁶

4.11.2 MUESTREO₁₆

Proporcionar muestras de 10 mL o 10 gramos para cada una de las pruebas requeridas en la monografía correspondiente.¹⁶



4.11.3 PROCEDIMIENTO¹⁶

Preparar la muestra que se desea analizar con un tratamiento apropiado a sus características físicas y que no altere el número y tipo de microorganismos presentes originalmente, a fin de obtener una solución o suspensión de la totalidad o parte de la muestra que sea adecuada para el o los procedimientos de prueba que se deben llevar a cabo¹⁶

En el caso de ceras, cremas, ungüentos y líquidos inmiscibles con agua, preparar una suspensión con ayuda de una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril adecuado (por ejemplo, uno de los polisorbatos), utilizando un mezclador mecánico y calentando a una temperatura que no exceda de 45°C, si fuera necesario, y proceder con la suspensión según se indica en Recuento Total de Microorganismos Aerobios y en Prueba para determinar la ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y Prueba para determinar la ausencia de *Salmonella spp* y *Escherichia coli*.¹⁶

4.11.4 MÉTODO DE RECUESTO DE MICROORGANISMOS¹⁷

Se basa en factores tales como la naturaleza del producto y el límite de microorganismos requerido. El método seleccionado debe permitir que se someta a prueba un tamaño de muestra suficiente para juzgar el cumplimiento con la especificación.¹⁷

Método de extendido en placa.¹⁷

Es el método de elección para anaerobios facultativos y cultivo de microaerófilos

Método de vertido en placa. ¹⁷

Esta técnica se usa generalmente para bacterias aerobias obligatorias

4.11.5 VALORACION¹⁷:

Es de las formas farmacéuticas más engorrosas en el tratamiento de la muestra
Microbiología: Este tipo de forma sufre con Frecuencia contaminación

- Aerobios y Mesófilos
- Hongos y Levaduras



- Staphylococcus aureus*
- Pseudomona aeruginosa*
- Enterobacterias
- Clostridium*

4.11.6 MEDIO DE CULTIVO¹⁸

El medio de cultivo es la combinación solida o liquida de nutrientes y agua. Usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos y vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina Medio Basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con varias sustancias.¹⁸

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta: sin agua y nutrientes minerales la 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. ¹⁸

Tabla 7. Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos vegetales¹⁸

Agua		
Sustancias orgánicas	Elementos	
	Macro	Micro
Azúcares Aminoácidos Auxinas Citoquininas Giberelinas Acidoabcsico	N P K Ca Mg S	Fe Zn B Mn Cu Ni Co Al Mo I



Medio solido¹⁹

Medio solido es todo aquel que contiene un agente gelificante. La dureza del medio depende principalmente de dos factores¹⁹:

pH: es necesario un pH de 3,5-4,0 como mínimo para que el gelificante actúe; a pH menor de 3,5 el medio se puede licuar. Hay que tener en cuenta que después del autoclavado el pH baja en promedio medio punto y que sigue bajando durante el cultivo.¹⁹

Composición química del medio: algunos gelificantes (p.e. Gelrita) solidifican en presencia de cationes divalentes, por lo que si el medio a utilizar es bajo en sales puede resultar conveniente añadir una cierta concentración d un catión divalente.¹⁹

Los gelificantes más usados en el cultivo in vitro son¹⁹:

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. La planta no puede digerirlo ni adsorberlo, además no interactúa con los componentes nutritivos del medio.¹⁹

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 coste.¹⁹

Gelrita: es un heteropolisacaridoanionico 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 cuajan más rápidamente. El coste de la gelrita es menor que el del agar.¹⁹



4.12 RECUENTO MICROBIANO

4.12.1 TÉCNICAS DE RECUENTO

Finalizado el tiempo de incubación, se realiza el recuento²⁰.

- Se toman en cuenta únicamente aquellas cajas Petri que tengan entre 30 y 300 colonias.
- Este número de colonias es estadísticamente representativo.
- Aquellas placas que tengan más de 300 colonias se reportan como “INCONTABLES”.
- Para el recuento bacteriano se puede usar cuenta colonias
- Puede ser contada toda la placa o por cuadrantes.
- Cuando la carga bacteriana es alta, se toma en cuenta un cuadrante con carga alta, y se multiplica por cuatro.
- Luego se suma el resultado de ambas diluciones realizadas por duplicado y se saca el promedio.
- Los resultados se expresan en colonias por ml. Los resultados también pueden expresarse en unidades formadoras de colonias (UFC), el valor de UFC es un valor que expresa el número relativo de microorganismos de un taxón determinado en un volumen de un metro cúbico de muestra.
- Terminado el conteo por cualquier método, se debe aplicar la siguiente fórmula para obtener el No. de UFC/ ml o UFC/g.

$$\text{UFC/ml ó UFC/g} = \frac{\text{No. de colonias por placa} \times \text{el factor de dilución}^*}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$

*Factor de dilución: inversa de la dilución



4. HIPOTESIS

Los resultados de Ensayos Microbiológico del producto Fitoterápico Mariguanol, indican que es una falsificación artificiosa que no cumple con las especificaciones requeridas para un producto natural de acuerdo al RTCA vigente



5. MATERIAL Y MÉTODO

DISEÑO METODOLOGICO

5.1 Tipo de estudio:

Experimental y Descriptivo

Área de estudio:

Laboratorio de Farmacognosia y Microbiología del departamento de Farmacia Industrial de la carrera de Farmacia facultad de Ciencias Químicas de la UNAN-león

5.2 Universo:

Productos Fitoterapicos en presentaciones semisólidas, Comercializados en los departamentos de Nicaragua utilizados como rubefaciente y analgésico.

5.3 Muestra:

Veinticuatro pomos de producto Mariguanol en gel comercializado en los departamentos de Chinandega, León, Estelí y Managua

- ✓ 6 Pomos de 30 gramos cada uno, procedentes de diferentes establecimientos fitomedicinales de León
- ✓ 6 Pomos de 30 gramos cada uno, procedentes de diferentes establecimientos fitomedicinales de Chinandega
- ✓ 6 Pomos de 30 gramos cada uno, procedentes de diferentes establecimientos fitomedicinales de Estelí
- ✓ 6 Pomos de 30 gramos cada uno, procedentes de diferentes establecimientos fitomedicinales de Managua



5.4 Criterios de inclusión:

Productos fitomedicinales en presentación farmacéutica semisólida de mayor venta a nivel nacional, elaborados bajo dudosa aprensión de manufactura y que no cumplan con reglamento fitosanitario de registro

5.5 Criterios de exclusión:

Productos fitomedicinales en presentación farmacéutica semisólida de mayor venta a nivel nacional, elaborados bajo adecuadas normas de manufactura y que cuenten con registro fitosanitario

5.6 Unidad de análisis:

Gel fitomedicinal

5.7 Plan de análisis:

Realizar pruebas microbiológicas para verificar la calidad del producto Fitoterápico Mariguanol gel mediante:

- Prueba de Recuento de organismos Mesófilos aerobios, tomando en cuenta las características de crecimiento bacteriano y periodo de incubación.
- Determinación de microorganismos patógenos
- Recuento de hongos filamentosos y levaduras

5.8 Variables a estudiar

- ✓ Limite microbiano
- ✓ Bacterias aerobias mesofilas
- ✓ Hongos y levaduras
- ✓ Bacterias patógenas



5.8.1 Tabla 8. Operacionalización de las variables

Variable estudiar	a	Definición	Indicadores	Escala de medición
5.8.1.1 Limite microbiano		Recuento de los microorganismos viables presentes en una muestra no estéril, para determinar si se encuentra dentro de los límites establecidos.	Hongos y levaduras $\leq 10^2$ <i>E. coli</i> Ausencia <i>Pseudomona a.</i> Ausencia <i>Salmonella</i> Ausencia <i>Staphylococcus a.</i> Ausencia	Presencia Ausencia
✓ Bacterias aerobias mesofilas		Bacterias que viven en presencia de oxígeno libre a temperaturas entre 15° C y 45° C.	UFC	Presencia Ausencia
✓ Hongos y levaduras	y	Organismos eucarióticos, quimioheterotrofos, con una pared celular que puede contener quitina, celulosa o ambas.	UFC	Presencia Ausencia
✓ Bacterias patógenas		Se encuentran presentes en los alimentos, pueden originar las intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias	UFC	Presencia Ausencia



5.9 PROCEDIMIENTO:

I. Actividades a realizar

a.1. procedimiento para la adquisición de la muestra

Para la adquisición de la muestra se consideró los departamentos de Chinandega, León, Estelí y Managua en los cuales fue conocido a través de un índice de comercialización realizado en 2010 al ser los departamentos con mayor auge de consumo y ventas de fitomedicamentos, posteriormente se procedió la gestión de compra en dichos departamentos indicando considerando los puntos de mayor afluencia por parte de la población (mercados), para cumplir con el requisito de inclusión como era productos fitomedicinales en presentación farmacéutica semisólida de mayor venta a nivel nacional, elaborados bajo dudosa aprensión de manufactura y que no cumplan con reglamento fitosanitario de registro.

a.2 Procedimiento para Determinación de Microorganismos

Recomendaciones Generales:

- ✓ Toda muestra deberá analizarse bajo condiciones asépticas.
- ✓ El tiempo transcurrido desde la primera dilución hasta su incorporación en el medio de cultivo, no deberá exceder de una hora.
- ✓ Antes de proceder a realizar el análisis microbiológico los envases que contienen la muestra, deberán ser limpiados con algodón y alcohol de 70°, y se debe esperar a que seque el envase para luego iniciar el trabajo.

a. Preparación de la muestra

1. Se tomaron cuatro pomos de Mariguanol de cada departamento en estudio.
2. Se tomó la mitad de cada gel de los cuatro pomos para obtener nuestro pool utilizando una espátula diferente, esta previamente esterilizada, para cada pomo.
3. Luego se adiciono 10g del pool a un erlenmeyer que contenía 90 mL de solución fosfato (diluyente), para obtener nuestra dilución 10^{-1}
4. De la mezcla del punto 3, se tomó 1mL y se adiciono a un tubo de ensayo que contenía 9mL de solución fosfato dilución 10^{-2} , de esta se tomó 1mL y se agregó a otro tubo de ensayo que contenía 9mL de solución fosfato dilución 10^{-3} , de igual modo hasta llegar a obtener diluciones hasta 10^{-5} .



5. Trabajando por duplicado se adiciono un mililitro a cada plato Petri, luego se adiciono el medio de cultivo estéril Agar Tripitica Soya a una temperatura de 45⁰C adicionando de 15 a 18 mL a cada plato Petri.
6. Posteriormente trabajando por duplicado se adiciono un mililitro a cada plato Petri, luego se adiciono el medio de cultivo estéril Agar Saburaud Dextrosa a una temperatura de 45⁰C adicionando de 15 a 18 mL a cada plato Petri. Se agito suavemente en forma de ocho hasta logra una homogenización muestra-agar.
7. Del pool se tomó 10g de la muestra y se adicionaron a un erlenmeyer que contenía 90 mL de caldo lactosa, luego se tomaron de nuevo del pool otros 10g y se agregaron a un erlenmeyer que contenía 90mL de caldo Triptica Soya. Se agito suavemente en forma de ocho hasta logra una homogenización muestra-agar.
8. En una caja Petri se adiciono de 15 a 18 mL de Agar estéril Triptica Soya para el Control de la esterilidad del medio de cultivo y a otra placa petri para Control del Medio Ambiente del mismo medio, se adiciono de 15 a 18 mL y se dejó la placa Petri abierta por 10 minutos.
9. Seguido en una caja Petri se adiciono de 15 a 18 mL de Agar Saburaud Dextrosa para el Control de la esterilidad del medio de cultivo y a otra placa Petri para Control del Medio Ambiente del mismo medio, se adiciono de 15 a 18 mL y se dejó la placa Petri abierta por 10 minutos.
10. Se procedió a la incubación a diferentes temperaturas de las muestras para Bacteria Aerobias Mesófitas a 36-37⁰C por 48 hrs. Y para Hongos y Levaduras a 20-22⁰C de 5 a 7 días de incubación, para proceder a su recuento.

a.2.1.Recuento De Organismos Mesofilos Aerobios

Método En Placa:

NOTA: En función del grado de contaminación esperado en el producto, efectuar las diluciones decimales que se estimen convenientes para que 1 g contenga entre $< 10^4$ UFC / g (mayor significado estadístico). Cuando no se tiene antecedentes al respecto es conveniente efectuar hasta la dilución 10^{-3} y ampliar o reducir el número de diluciones en base a la experiencia



a.2.1.1 Efectuar tres diluciones decimales:

- Primera dilución: se toman 10 ml de muestra. Se añaden a 90 ml del diluyente seleccionado contenido en un Erlenmeyer.
- Segunda dilución: Transferir 1 ml de la primera dilución a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de solución diluida de Fosfatos pH 7.2 (diluyente).
- Tercera dilución: Transferir 1 ml de la segunda dilución a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de solución diluida de Fosfatos pH 7.2 (diluyente).

NOTA: Utilizar una pipeta única para cada dilución.

- ✓ Simultáneamente inocular por duplicado 1 ml de cada dilución del producto en platos petri, añadir a cada placa 15 –20 ml de medio Agar tripticaseína previamente esterilizado y mantenido en baño María a temperatura entre 45-48 °C (para mantenerlo fundido).
- ✓ Con movimientos suaves rotatorios, mezclar la alícuota de la muestra con el medio de cultivo, evitando que se produzca un derrame. Permitir que el medio solidifique e incubar las placas en posición invertida a 35 °C - 37 °C , durante 48 – 72 horas.
- ✓ Después del período de incubación contar el número de UFC con ayuda del contador de colonias. Se determina la media o promedio de UFC por cada dilución. Informar el número de UFC por gramo o por ml del producto, considerando el factor de dilución de la muestra.
- ✓ El producto se acepta si se observan UFC en cantidades menores de 10^5 UFC por ml de muestra.



a.2.2 Recuento De Hongos Filamentosos Y Levaduras

- ✓ Se procedió igual como se indica en el recuento de organismos mesofilos aerobios, con la excepción que se utiliza el medio agar dextrosa – sabouroud o agar dextrosa – papa. incubar a 22°C - 25°C durante cinco a siete días.
- ✓ Después del período de incubación contar el número de UFC existentes con ayuda del contador de colonias. Informar el número de UFC por ml de muestra, tomando en cuenta el factor de dilución de la muestra. El producto se acepta si hay ausencia de colonias o la cantidad existente es menor de 10^2 colonias por ml de muestra.

a.2.3 Determinación De Microorganismos Patógenos.

a.2.3.1 Staphylococcus aureus

Medir 10 ml de muestra con 90 ml de cultivo enriquecido a 35°C - 37°C, durante 24 – 48 horas. Examinar el medio visualmente. Si hay crecimiento, a partir del caldo, hacer una resiembra por estría cruzada en Agar Bair Parker e incubar los platos en posición invertida a 35°C - 37°C, durante 24 – 48 horas. Deberá establecer la ausencia del patógeno para considerar conforme la prueba

a.2.3.2 Salmonella

- ✓ Medir 10 ml de muestra y añadir a un volumen de 90 ml de Caldo Lactosa e incubar a 35°C - 37°C, durante 24-48 horas. Examinar el medio para ver si hay crecimiento (turbidez).
- ✓ Si lo hay, agitar el medio y tomar 1ml y añadirlo a tubos de ensayo (2) que contienen 10 ml de Caldo Selenito-cistina y Caldo tetracionato. Mezclar e incubar de 12 a 24 horas a 35°C - 37°C.
- ✓ Una vez incubado, con un asa se toma una muestra a los tubos de ambos caldos y se efectúa una resiembra al menos en dos medios sólidos diferentes. Se puede elegir entre los siguientes: Agar verde Brillante, xilosa-lisine-dexosicolato y agar citrato-desosicolato. Invertir los platos e incubar a 35°C – 37°C, durante 48 – 72 horas. Deberá establecer la ausencia del patógeno para considerar conforme la prueba



a.2.3.3 Escherischia coli

Medir 10 ml de muestra y añadir a un volumen de 90 ml de Caldo Lactosa e incubar a 35°C - 37°C, durante 24-48 horas. Examinar el medio para ver si hay crecimiento (turbidez). Si lo hay, transferir con un asa al Agar Mac Conkey. Incubar de 48 a 72 horas a 35°C - 37°C. Deberá establecer la ausencia del patógeno para considerar conforme la prueba



ANALISIS DE LOS RESULTADOS



Tabla No 1 Resultados Flora Aerobia Mesófilas

RESULTADOS OBTENIDOS MEDIO DE CULTIVO TRIPTICA SOYA														
Muestras	Lectura a las 24 hrs						Lectura a las 48 hrs							
	DILUCIONES													
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	C.*	C.¥	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	C.*	C.¥
M1	∞	∞	∞	250 UFC/g	32 UFC/g	0 UFC	2 UFC	∞	∞	∞	272 UFC/g	108 UFC/g	0 UFC	2 UFC
M2	∞	∞	∞	220 UFC/g	26 UFC/g			∞	∞	∞	258 UFC/g	98 UFC/g		
M3	∞	∞	∞	228 UFC/g	22 UFC/g			∞	∞	∞	240 UFC/g	76 UFC/g		
M4	∞	∞	∞	230 UFC/g	23 UFC/g			∞	∞	∞	262 UFC/g	94 UFC/g		

M1: Muestra 1 Adquirida en el departamento de León
M2: Muestra 2 Adquirida en el departamento de Chinandega
M3: Muestra 3 Adquirida en el departamento de Managua
M4: Muestra 4 Adquirida en el departamento de Estelí
UFC/g: Unidades Formadoras de Colonias por gramos
∞: >300UFC/g
C.*: Control del medio
C.¥: Control de ambiente

La tabla 1 evidencia los resultados obtenidos para el ensayo de Bacterias Aerobias Mesófilas aplicado a muestras de Mariguanol gel, de los diferentes departamentos con el medio Triptica Soya; del cual posterior a la incubación se procedió a realización de las lecturas, para lo cual a las 24 horas de incubación se obtuvieron más de 300 UFC/g en las diluciones 10⁻¹-10⁻³ para todas las muestras ensayadas; dichos valores sobre pasan el valor contable por placa, por lo cual para las diluciones 10⁻⁴-10⁻⁵ se logro identificar con exactitud en base el recuento que la muestra M1 presenta el mayor índice de contaminación seguido de las muestras M2, M4 y M3, dichos valores corresponden a valores por encima del R.T.C.A vigente sección microbiológica para flora aerobia mesofila cuyo límite es ≤10²

Los resultados de las 48 horas reflejan la confirmación en cuanto a que en las diluciones 10⁻⁴-10⁻⁵ se logro identificar con exactitud en base el recuento que la muestra M1 presenta el mayor índice de contaminación seguido de las muestras 2,4,3, y que dichos valores corresponden a valores por encima del R.T.C.A vigente sección microbiológica de para flora aerobia mesofila cuyo límite es ≤10²

No se evidencio crecimiento en el control del medio, el control de ambiente, se evidencia poco crecimiento de flora de ambiente.



Tabla No 2 Resultados de las características Morfológicas

MORFOLOGÍA COLONIAL BACTERIANA

Muestras	Superficie	Borde	Forma	Pigmentación
M1	Plano-convexa	Redondeado	circular	Verde musgo
M2	Convexa	Ondulado	irregular	Verde pálido
M3	Convexa	Redondeado	circular	Verde; crema
M4	Convexa	Redondeado	circular	Crema

M1: Muestra 1 Adquirida en el departamento de León

M2: Muestra 2 Adquirida en el departamento de Chinandega

M3: Muestra 3 Adquirida en el departamento de Managua

M4: Muestra 4 Adquirida en el departamento de Estelí

Plano-convexa:

Convexa:

Redondeado:

Ondulado:

Circular:

Irregular:



La tabla 2 evidencia la morfología de las colonias obtenidas en la determinación de Bacterias Aerobias Mesofilas en medio de cultivo Triptica Soya, aplicado a muestras de Mariguanol gel; La morfología de las colonias es una de las características básicas de las bacterias y es indispensable su estudio para comenzar correctamente una identificación preliminar.

Los resultados evidencian que las bacterias desarrolladas presentaron amplia variedad de tamaños y formas, predominado principalmente bacterias de borde redondeado, superficie convexa y forma circular de coloraciones verdosas, para las muestras de los diferentes departamentos.



Tabla 3 Resultados Bacterias Aerobias Mesófilas en medio selectivos

RESULTADOS OBTENIDOS EN MEDIO SELECTIVO

Medio	BAM	M1	M2	M3	M4
Baird Parker	<i>Staphylococcus spp.</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
EMB	<i>Esherichia coli</i>	Ausencia	Presencia	Presencia	Ausencia
Cetrimide	<i>Pseudomona spp.</i>	Presencia	Presencia	Presencia	Ausencia
XLD	<i>Salmonella spp.</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

M1: Muestra 1 Adquirida en el departamento de León

M2: Muestra 2 Adquirida en el departamento de Chinandega

M3: Muestra 3 Adquirida en el departamento de Managua

M4: Muestra 4 Adquirida en el departamento de Estelí

BAM: Bacterias Aerobias Mesofilas

EMB: Eosina Azul de Metileno

XLD: xilosa-lisine-dexosicolato

La tabla 3 nos refleja el resultado obtenidos en medios de cultivo selectivo posterior a la resiembra de colonias obtenidas en la lectura de Bacterias aerobias mesofilas en medio de cultivo Triptica soya en muestras de Mariguanol gel; para los cual los resultados obtenidos evidencian que la muestra M1 mostro crecimiento de *Pseudomona spp.* (El Medio Cetrimide medio selectivo para *Pseudomona spp.*, se observa la características de las colonias , color verde y fluorescentes a la luz UV); Para la muestra M2 se evidencia la presencia de *Esherichia coli* (El Medio EMB medio selectivo para *Escherichia coli* se confirma la presencia de esta bacteria en las muestras M2 y M3, ya que las colonias mostraron color verde con brillo metálico a luz reflejada) y *Pseudomona spp.*; para la muestra M3 se determino el crecimiento de *Esherichia coli* y *Pseudomona spp.* ; La muestra M4 no evidencia crecimiento de bacterias enteropatógenas en los medios de cultivo selectivos ensayados.

En Medio Baird Parker medio selectivo para *Staphylococcus spp.*, mostro ausencia ya que las características para indicar esta bacteria son halos y anillos con coloración negra

De lo anterior se refleja que las muestras M1, M2 y M3 no cumplen con los requisitos establecidos para la ausencia de bacterias entero patógenas de acuerdo a R.T.C.A para formas farmacéuticas de uso tópico.



Tabla 4 Resultados obtenidos de cultivo Sabouraud

RESULTADOS OBTENIDOS MEDIO DE CULTIVO SABOURAUD							
Muestras	Lectura a las 7 días						
	DILUCIONES					C.*	C.¥
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		
M1	∞	∞	∞	276 UFC/g	30 UFC/g	0 UFC	2 UFC
M2	∞	∞	∞	264 UFC/g	19 UFC/g		
M3	∞	∞	∞	268 UFC/g	21 UFC/g		
M4	∞	∞	∞	272 UFC/g	24 UFC/g		

M1: Muestra 1 Adquirida en el departamento de León
 M2: Muestra 2 Adquirida en el departamento de Chinandega
 M3: Muestra 3 Adquirida en el departamento de Managua
 M4: Muestra 4 Adquirida en el departamento de Estelí
 UFC/g: Unidades Formadoras de Colonias por gramos
 ∞: >300UFC/g
 C.*: Control del medio
 C.¥: Control de ambiente

La tabla 4 evidencia los resultados obtenidos para el ensayo de Hongos y Levaduras aplicado a muestras de Mariguanol gel, de los diferentes departamentos con el medio Sabouraud; del cual posterior a la incubación se procedió a realización de las lecturas, para lo cual a los 7 días de incubación se obtuvieron más de 300 UFC/g en las diluciones 10⁻¹-10⁻³ para todas las muestras ensayadas; dichos valores sobre pasan el valor contable por placa, por lo cual para las diluciones 10⁻⁴-10⁻⁵ se logro identificar con exactitud en base el recuento que la muestra M1 presenta el mayor índice de contaminación seguido de las muestras M4, M3 y M2, dichos valores corresponden a valores por encima del R.T.C.A vigente sección microbiológica de recuento de hongos y levaduras cuyo límite es ≤10²

No se evidencio crecimiento en el control del medio, el control de ambiente evidencia poco crecimiento de flora de ambiente



Tabla No 5 Determinación de pH

DETERMINACIÓN DE PH EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS	
Muestras	pH
M1	5.93
M2	5.6
M3	5.82
M4	5.22

M1 Muestra 1 Adquirida en el departamento de León
M2 Muestra 2 Adquirida en el departamento de Chinandega
M3 Muestra 3 Adquirida en el departamento de Managua
M4 Muestra 4 adquirida en el departamento de Estelí

La tabla 5 refleja la determinación de pH aplicado a muestras de Mariguanol gel, de los diferentes departamentos, obteniendo en todas las muestras un pH entre 5.22 a 5.93, presentando características levemente acida; estos valores se presume por el uso de vehículos o componentes en el momento de su elaboración que proporcionan las condiciones para obtener un pH similar al de la piel, ya que dado los resultados obtenidos anteriormente, el producto no cumple con las especificaciones establecidas por el R.T.C.A. vigente.



Tabla 6 Características organolépticas

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS				
Muestras	textura	olor	color	Presencia de grumos
M1	Homogénea de consistencia semiviscosa con pequeñas partes de hojas en su interior	Característico a esencia de alcanfor	Verde amarillo	Negativo
M2	Homogénea de consistencia semiviscosa	Característico a esencia salicilato de metilo	verde	Negativo
M3	Homogénea de consistencia semiviscosa con pequeñas partes de hojas en su interior	Característico a esencia alcanfor	Verde amarillo	Negativo
M4	Homogénea de consistencia semiviscosa con pequeñas partes de hojas en su interior	Característico a esencia de mentol	verde	Negativo

M1 Muestra 1 Adquirida en el departamento de León

M2 Muestra2 Adquirida en el departamento de Chinandega

M3 Muestra 3 Adquirida en el departamento de Managua

M4 Muestra 4 adquirida en el departamento de Estelí

La tabla 6 indica las características organolépticas de las muestras de Mariguanol gel, de los diferentes departamentos; Las que muestran consistencia semiviscosa, aspecto de gel homogéneo; igualmente se aprecia contenido de trozos de material vegetal para las muestras M1, M3 y M4, la muestra de Chinandega no evidencia contenido de trozos de material vegetal.

El olor percibido para las muestras M1 y M3 es mayormente característico para alcanfor, moderadamente para salicilato de metilo, para las muestras de Chinandega se percibe este ultimo en mayor grado, La muestra de Estelí percibe olor característico de mentol en mayor grado y moderado para salicilato de metilo.

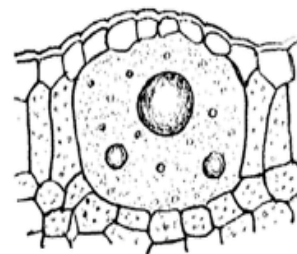
Las coloraciones obtenidas para las diferentes muestras resulta no ser homogéneo de verde a verde-amarillento.



RESULTADOS DE VALORACION MICROSCOPICA DE MATERIAL VEGETAL CONTENIDO EN MUESTRAS DE ENSAYO

Los resultados siguientes evidencian los hallazgos de la valoración microscópica realizada tras la valoración organoléptica y sensorial de las muestras de Mariguanol gel, de los departamentos; de León, Managua y Estelí, en la cual dichas muestras presentaban en su contenido trozos de material vegetal , el material vegetal en mención se procedió analizar según su contenido en comparación con material vegetal de

acuerdo a caracteres de claves botánicas evidenciando que el material vegetal corresponde aun borde aserrado, con la presencia de vesículas secretoras lo que indica ser una especie productora de aceites esenciales, a su vez los índices de estomas indican ser al menos dos especies diferentes las

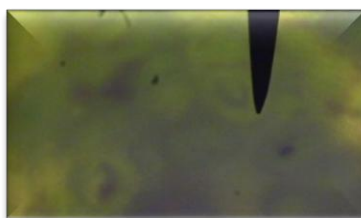


contenidas en las muestras de acorde a los diferentes índices de estomas obtenidos en la cual

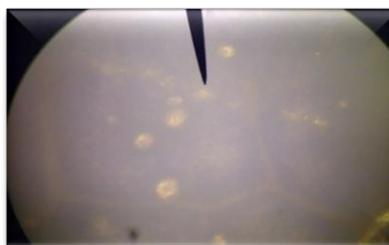


en la muestra de Estelí 365 estomas

En la muestra de Managua se observo 415 estomas,



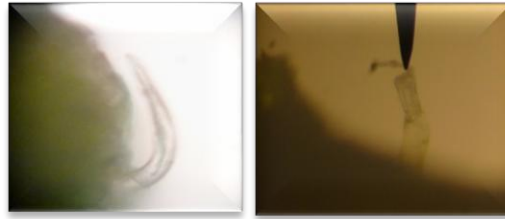
En la muestra de León 24 estomas





Un aspecto que resalta en las muestras es la presencia de tricomas característicos de acorde con la bibliografía con *Cannabis sativa*,

En la muestra de Estelí



Otro aspecto observado fue el tipo de venación en los trozos de material vegetal de la muestra de Managua, de tipo reticular.



Las hojas de *Cannabis sativa*, están cubiertas de tricomas glandulares en cuya secreción se encuentran varios alcaloides con efectos alucinógenos. En el análisis realizado en los trozos de material vegetal que contenían tres de las cuatro muestras ensayadas, reflejaron tener tricomas pero no del tipo de *C. sativa*, de igual manera en el análisis de números de estomas, las muestras evidenciaron tener diferentes cantidades de estomas, por lo que no tiene las características botánicas de *C. sativa*.



CONCLUSION

Realizado el trabajo experimental se concluye que:

El análisis microbiológico efectuado en muestras de Mariguanol, obtenidas en diferentes departamentos, evidenciaron un alto grado de contaminación bacteriana, con valores por encima del rango de aceptación establecido por el Reglamento Técnico Centroamericano R.T.C.A 11.03.56:09 vigente sección microbiológica para flora aerobia mesófila cuyo límite es $\leq 10^2$.

Las muestras analizadas evidenciaron la presencia de bacterias patógenas, como *Esherichia coli*, *Pseudomona ssp.* y *Salmonella spp.* Por lo que estas no cumplen con el R.T.C.A. 11.03.56:09, ya que estas bacterias no deben estar presentes en ninguna forma farmacéutica, por poner en riesgo la salud del paciente.

En el recuento de hongos y levaduras, las muestras ensayadas reflejaron valores que sobre pasan el rango de aceptación establecido por el Reglamento Técnico Centroamericano R.T.C.A 11.03.56:09 vigente cuyo límite es $\leq 10^2$

Dado el carácter legal de consumo de la especie *C. sativa*, muestra testigo no logro adquirirse en la presente investigación de material vegetal aislado de las muestras en estudio perteneciente a los departamentos de León, Managua y Estelí para corroborar el carácter descrito es las referencias bibliográficas acerca de las claves taxonómicas de la especie.



RECOMENDACIONES

Basado en el estudio realizado se recomienda:

- Realizar ensayos fisicoquímicos que permitan la cuantificación de los componentes presentes en el marbete del producto en estudio Mariguanol, que declara que contiene mentol, alcanfor y salicilato de metilo.
- Efectuar estudios para la verificación de la calidad a productos medicinales de mayor auge que no cuenten con registro sanitario.
- Al realizar un análisis en productos medicinales, tomar como referencia el Reglamento Técnico Centroamericano 11.03.56:09 que indica las pruebas a realizar según la presentación farmacéutica.
- Persuadir como profesionales de la salud a la población, a tener mayor cuidado con los productos a base de plantas que se distribuyen libremente en mercados y pulperías, sin ningún respaldo científico.



BIBLIOGRAFÍA

1. Sin e. *Seminario II. Control de calidad de productos naturales recuperado el 02 de marzo de 2012*, de <http://www.fcn.unp.ar/sitio/farmacognosia/>
2. Pérez, L. (2009). *Requisitos de calidad de Productos Naturales Medicinales*. Recuperado el 02 de marzo del 2012, de <http://www.colegiodequimicosyfarmaceticoselsalvador.com/congreso/SalonB/Requisitos-calidad-de-porodCONGRESO-EL-SALVADOR-2009.pdf>
3. Silva, J.Valle, M (2011) *Verificación de la calidad de un producto fitoterapeutico en capsulas comercializados en los departamentos de Managua, Estelí y León*. UNAN-León, Nicaragua, León.
4. Pérez, B. Picardo Y. (2011) *Evaluación de la calidad de te comercializado en supermercados de la ciudad de León*. UNAN-León, Nicaragua, León
5. Pérez, L. (2009). *Requisitos de calidad de Productos Naturales Medicinales*. Recuperado el 02 de marzo del 2012, de <http://www.colegiodequimicosyfarmaceticoselsalvador.com/congreso/SalonB/Requisitos-calidad-de-porodCONGRESO-EL-SALVADOR-2009.pdf>
6. Sharipin, Nikolai et al.(2000) *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapeuticos*. Santafé de Bogota, D. C.: Convenio Andres Bello (cab) y programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnologia para el Desarrollo (CYTED)
7. Pérez, L. (2009). *Requisitos de calidad de Productos Naturales Medicinales*. Recuperado el 02 de marzo del 2012, de <http://www.colegiodequimicosyfarmaceticoselsalvador.com/congreso/SalonB/Requisitos-calidad-de-porodCONGRESO-EL-SALVADOR-2009.pdf>
8. Pacheco, I. Recuperado el 29 de noviembre de 2012, de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/geles_112.pdf
9. sin e. *Recuperado el 29 de noviembre del 2012*, de <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r48168.DOC>
10. Pacheco, I. Recuperado el 29 de noviembre de 2012, de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/geles_112.pdf



11. *sin e. Recuperado el 29 de noviembre del 2012, de <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r48168.DOC>*
12. Pacheco, I. Recuperado el 29 de noviembre de 2012, de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/geles_112.pdf
13. *sin e. Recuperado el 29 de noviembre del 2012, de <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r48168.DOC>*
14. Pacheco, I. Recuperado el 29 de noviembre de 2012, de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/geles_112.pdf

15. *sin e. Limite Microbiano. Recuperado el 4 de abril del 2012, de <http://es.scribd.com/doc/39227801/limite-microbiano>*
16. *sin e. Medios de Cultivo. Recuperado el 4 de abril del 2012, de <http://www.educa2.madrid.org/web/educamadrid/principal/files/0e8a6919-7eeb-423f-9fa8-b9c866aab3ff/Medios%20de%20cultivo.pdf>*
17. Izurieta Natalia. Recuento Bacteriano. Recuperado el 4 de abril del 2012, de <http://www.slideshare.net/nataliaizurieta/laboratorio-no-4-recuento-bacteriano-7723447>
18. *sin e. Medios de Cultivo. Recuperado el 4 de abril del 2012, de <http://www.educa2.madrid.org/web/educamadrid/principal/files/0e8a6919-7eeb-423f-9fa8-b9c866aab3ff/Medios%20de%20cultivo.pdf>*
19. Izurieta Natalia. Recuento Bacteriano. Recuperado el 4 de abril del 2012, de <http://www.slideshare.net/nataliaizurieta/laboratorio-no-4-recuento-bacteriano-7723447>
20. *sin e. Limite Microbiano. Recuperado el 4 de abril del 2012, de <http://es.scribd.com/doc/39227801/limite-microbiano>*
21. *Mariguanol se sigue vendiendo en Tegucigalpa. (2010). El Heraldo.hn. Recuperado el 02 de marzo de 2012, de <http://archivo.elheraldo.hn/Ediciones/2010/11/29/Noticias/Mariguanol-se-sigue-vendiendo-en-Tegucigalpa.html>*



22. *Marihuanol, pomada de marihuana.* (2011). Recuperado el 02 de marzo de 2012, de <http://bitacoradehemodialisis.blogspot.com/2011/09/marihuanol-pomada-de-marihuana.html>
23. *Venden ilegalmente pomada a base de marihuana.* (2010). Recuperado el 02 de marzo de 2012, de <http://www.lamarihuana.com/noticias/venden-ilegalmente-pomada-a-base-de-marihuana/>
24. La Prensa.hn. (2010). *Decomisan frascos de unguento Mariguanol.* Recuperado el 21 de marzo de 2012, de <http://archivo.laprensa.hn/País/content/view/full/444472>
25. Martinez, S. (2011). *Policía alerta ante contrabando menor.* Recuperado el 21 de marzo de 2012, de <http://www.laprensa.com.ni/2011/10/20/hechos/77461>
26. La Prensa.hn (2010). *Investigan venta del Mariguanol.* Recuperado el 21 de marzo de 2012, de <http://archivo.laprensa.hn/Sucesos/Ediciones/2010/09/27/Noticias/Investigan-venta-del-Mariguanol>

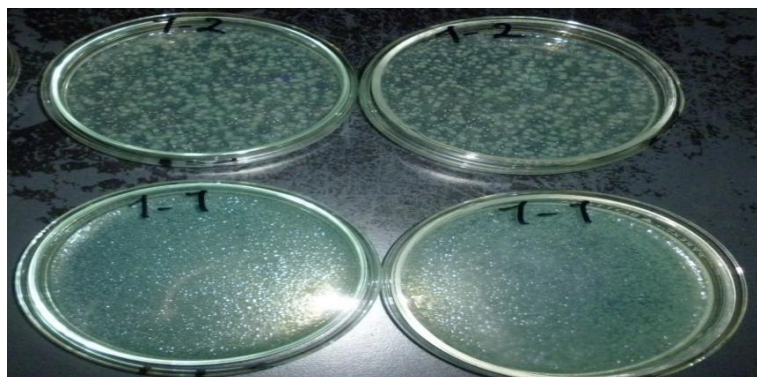


ANEXOS

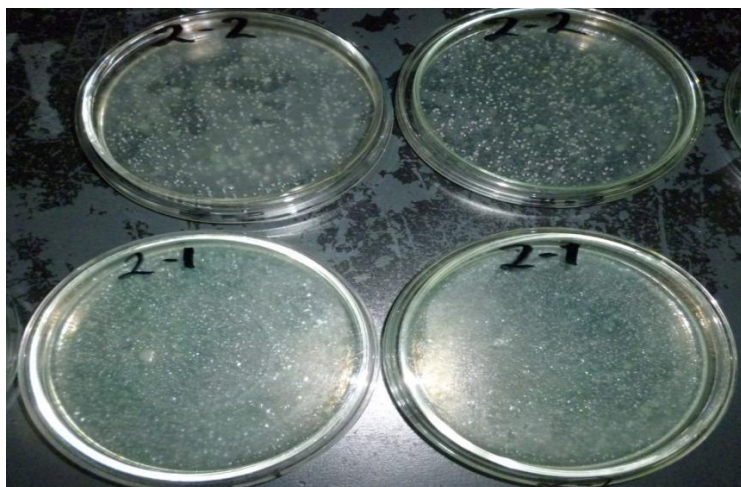
Anexo 1. Lectura 24 horas control de medio y ambiente



Anexo. 2 Lecturas de 24 horas

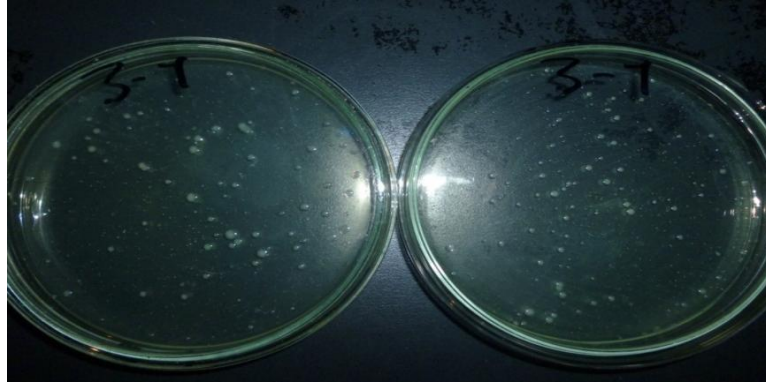


Anexo 3. Lectura de 24 horas muestra Chinandega

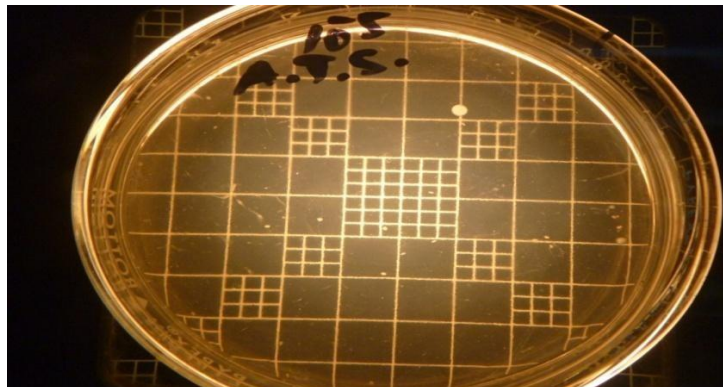
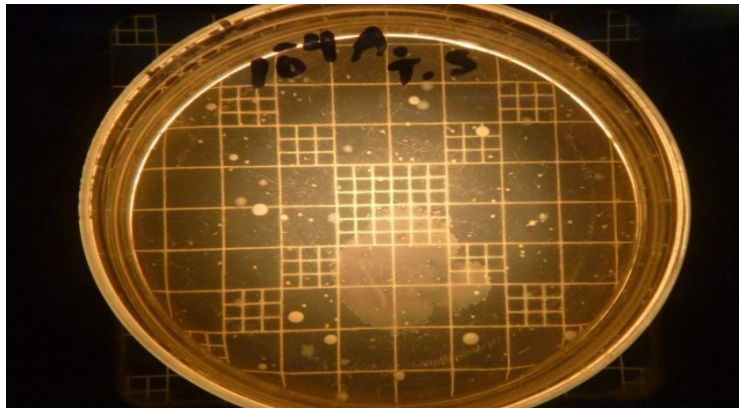




Anexo 4. Lectura de 24 horas muestra Managua

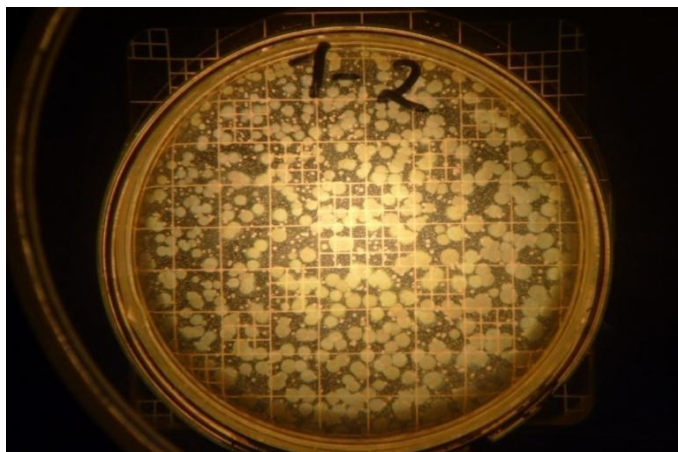


Anexo 5. Lectura de 24 muestra Estelí

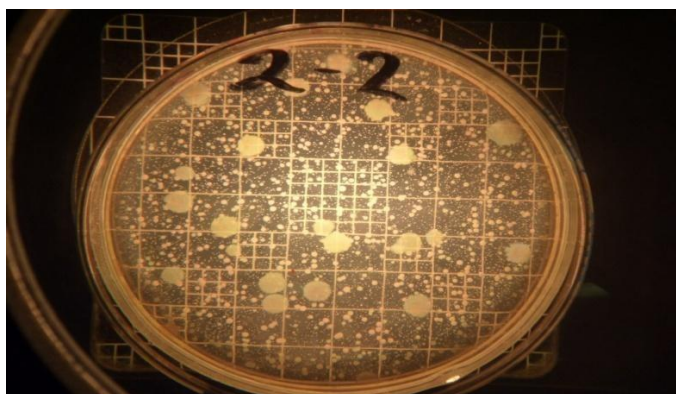
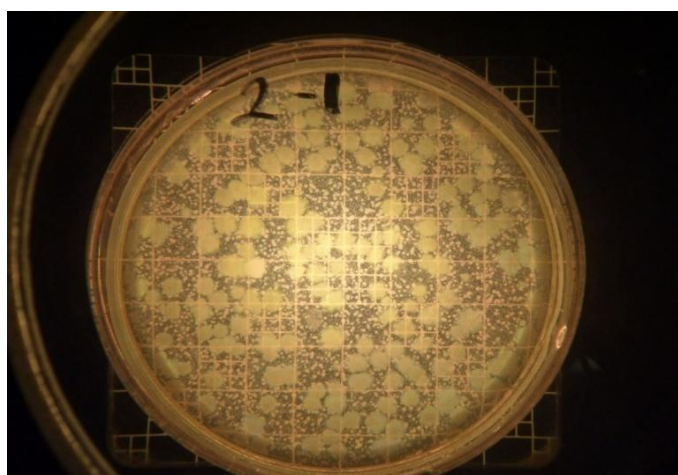




Anexo 5. Lectura de 48 horas de muestras de Leon

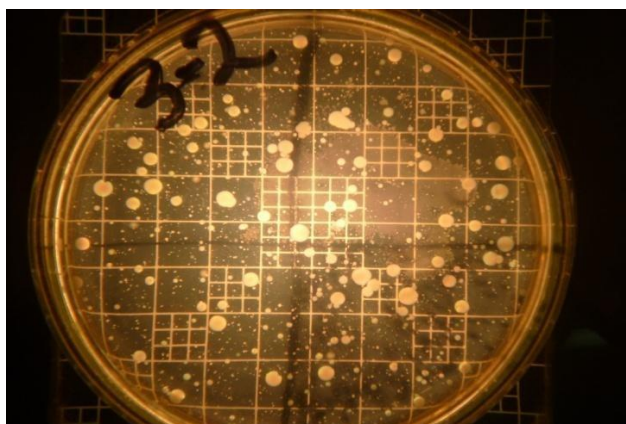
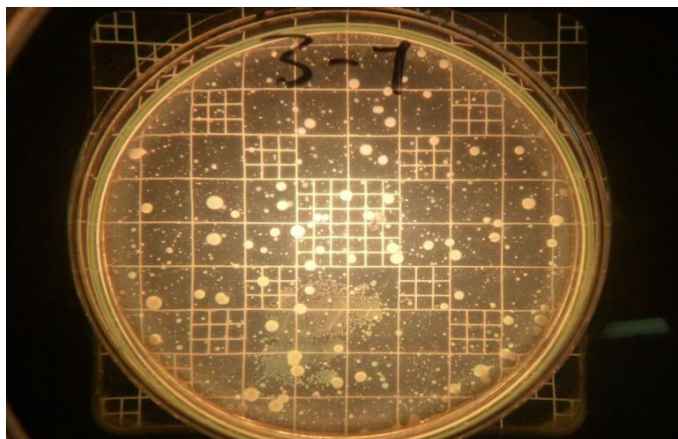


Anexo 6. Lectura de 48 horas muestra Chinandega

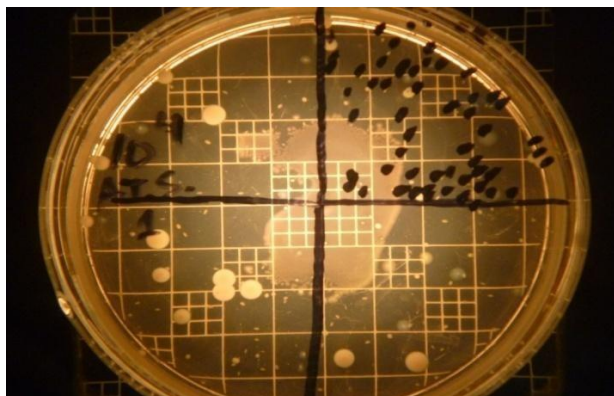


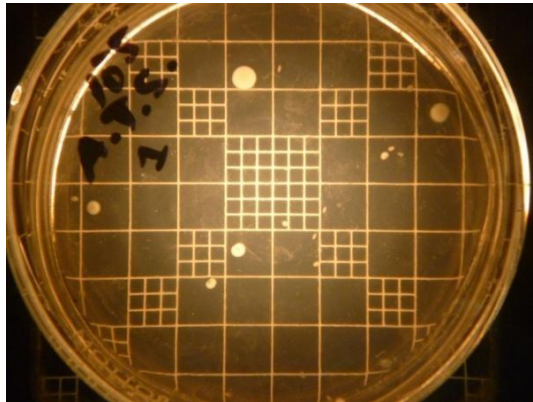


Anexo 8. Lectura de 48 horas muestra Managua



Anexo 9. Lectura 48 horas muestra Estelí

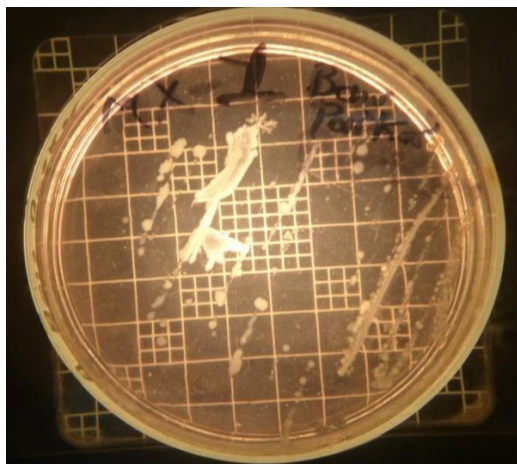




Anexo 10. Medio de enriquecimiento para *Salmonella* caldo selenito cistine



Anexo 11. Medio selectivo Baird Parker Muestra león





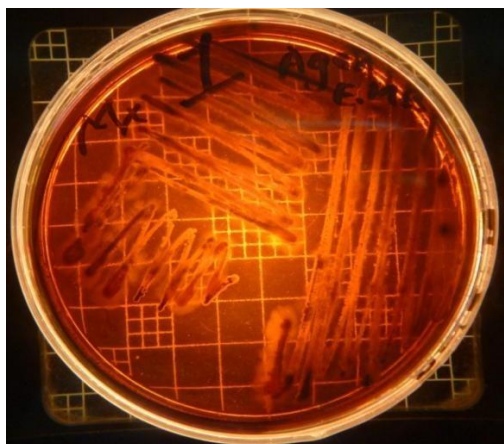
Anexo 12. Medio selectivo cetrimide muestra de León



Anexo 13. Medio selectivo XLD Muestra León



Anexo 14. medio selectivo EMB Muestra León





Anexo 15. Medio selectivo cetrimide Muestra Chinandega



Anexo 16. medio selectivo XLD muestra Chinandega



Anexo 17. Medio selectivo Baird Parker Muestra Chinandega

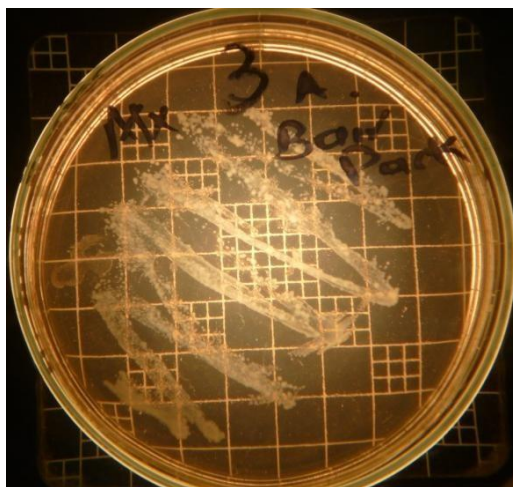




Anexo 18 Medio selectivo EMB Muestra Chinandega



Anexo 19. Medio selectivo Bair Parker muestra Managua



Anexo 20. Medio selectivo EMB Muestra Managua





Anexo 21. Medio selectivo XLD Muestra Managua



Anexo 22. Medio selectivo cetrimide Muestra Managua



Anexo 23. Medio selectivo Baird Parker





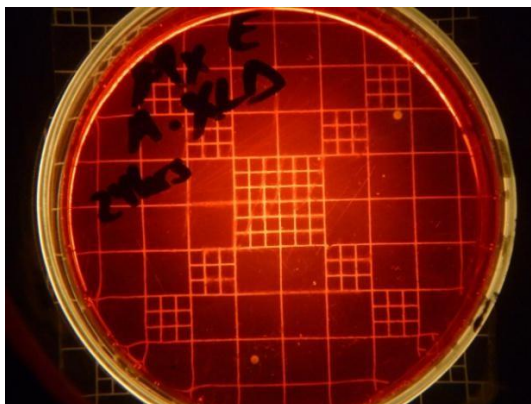
Anexo 24. Medio selectivo EMB Muestra Estelí



Anexo 25. Medio selectivo cetrimide Muestra Estelí

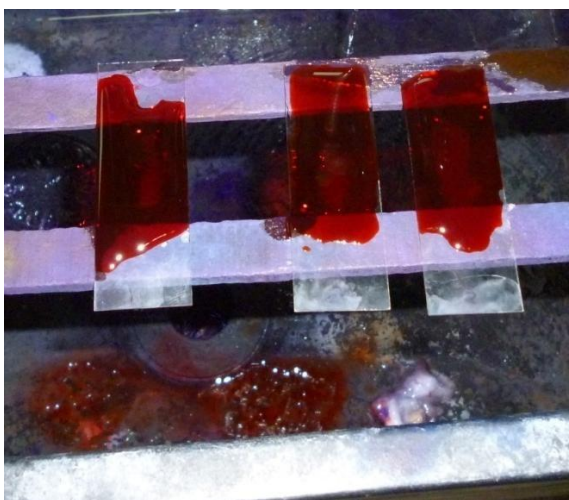
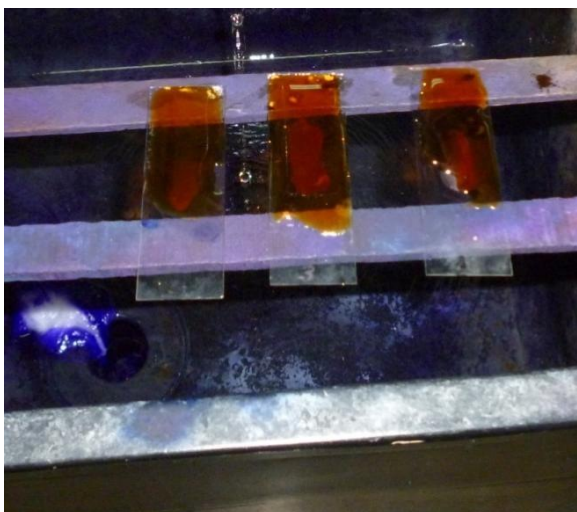


Anexo 26. Medio selectivo XLD muestra Estelí



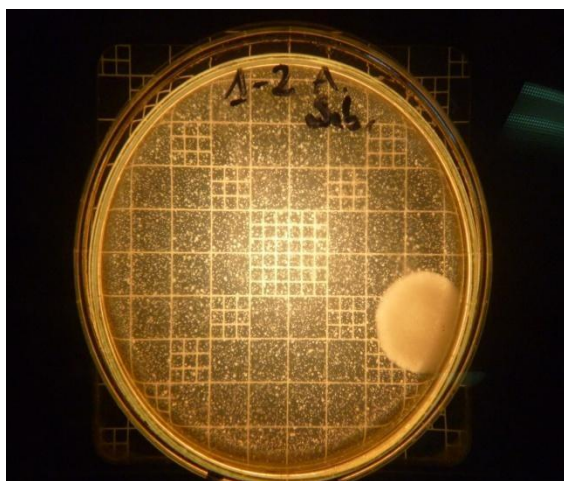


Anexo 27. Prueba confirmatoria de *Staphylococcus a.* en las muestras

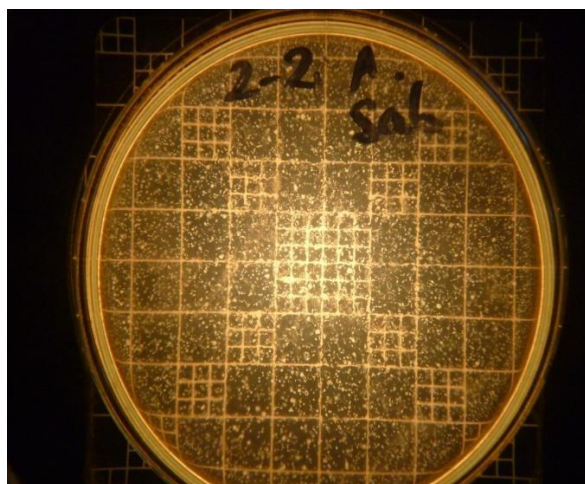




Anexo 28. Lectura de 7 días muestra León en medio sabouraud para hongos y levaduras



Anexo 29. Lectura de 7 días muestra Chinandega en medio sabouraud para hongos y levaduras

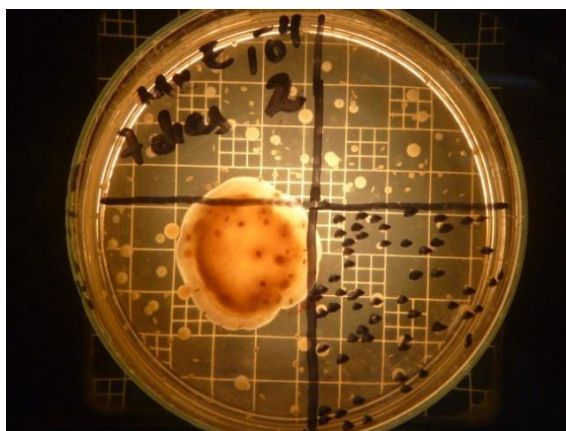


Anexo 30. Lectura de 7 días muestra Managua en medio sabouraud para hongos y levaduras

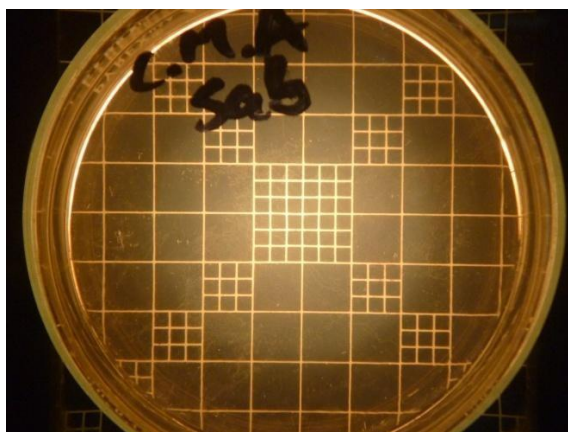




Anexo 31. Lectura de 7 días muestra Esteli en medio sabouraud para hongos y levaduras

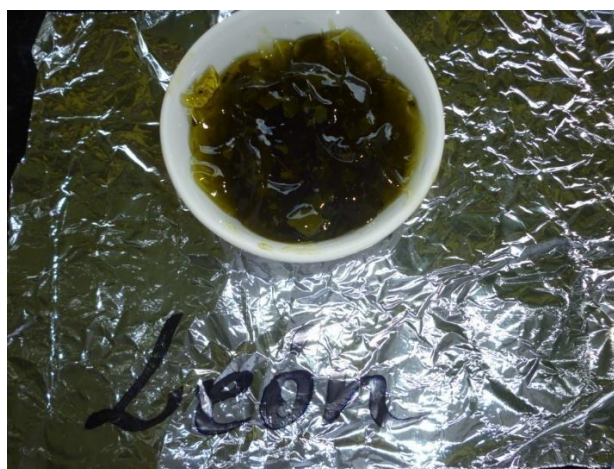


Anexo 32. Control del medio sabouraud para hongos y levaduras





Anexo 33. Características organolépticas de las muestras ensayadas









Anexo 34. Determinación de pH en las muestras ensayadas





Anexo 35. Muestras estudiadas



