

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
CARRERA DE FARMACIA**



**MONOGRAFIA PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIADO QUIMICO
FARMACEUTICO**

TEMA:

Determinación de la Calidad Microbiana en plantas de: *Annona muricata*, *Lippia alba*, *Guazuma ulmifolia* procedente de las farmacias botánicas de la ciudad de León, del Año 2008

AUTORES:

**Br. Brenda Luz Carrión Pérez.
Br. Pablo Emilio Cruz**

Tutora: Lic. Gloria Herrera

León, Nicaragua Marzo 2,008



DEDICATORIA

A DIOS:

Que me ha dado la vida, toda la fuerza para salir adelante, paciencia, perseverancia y hoy me regala ver cumplida la meta más importante para mí.

A MI HIJO:

Yesser Samuel, por ser la alegría de mi vida y el motivo de todo este esfuerzo.

A MI MADRE:

Que a pesar de todas las dificultades que la vida nos ha dado siempre estuviste a mi lado y hoy comparte conmigo este momento.

A MIS HERMANOS:

Por su gran paciencia y apoyo.



DEDICATORIA

A DIOS:

Por darnos la vida, las oportunidades y el deseo de culminar nuestro estudio.

A NUESTROS PADRES:

Por su apoyo incondicional a través de su amor y compañía.

A MI ESPOSA:

Por brindarme palabras de aliento para seguir adelante.

A MIS HIJAS:

Por soportar todo este tiempo que no estuve a su lado.



AGRADECIMIENTO

Hoy al haber realizado uno de nuestros grandes sueños, agradecemos a todas las personas que nos apoyaron con la realización de este trabajo monográfico.

Primeramente deseamos agradecerles a Dios y a la Virgen María por habernos instruido, guiado y brindarnos un poco de sabiduría en cada momento de nuestras vidas.

De manera especial:

A nuestra tutora **Lic. Gloria María Herrera** por brindarnos su apoyo, conocimiento y experiencia para que este trabajo pudiera realizarse exitosamente.

Al Equipo docente que con sus consejos, conocimientos y palabras de aliento nos supieron guiar a través de todos estos años y que con mucha paciencia nos supieron transformar en futuros hombres y mujeres de bien.

A nuestras familias que de una u otra manera nos apoyaron a lo largo de todo este tiempo brindándonos comprensión y aliento para seguir adelante.



INDICE

INTRODUCCION-----	1
OBJETIVOS-----	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA-----	4
MARCO TEORICO-----	5
DISEÑO METODOLOGICO-----	36
ANALISIS DE RESULTADOS-----	40
CONCLUSIONES-----	43
RECOMENDACIONES-----	44
BIBLIOGRAFIA-----	45
ANEXOS-----	46



INTRODUCCION

En Nicaragua, se cuenta con una cantidad abundante de recursos naturales, en especial la flora, la cual proporciona al ser humano alimento y sustancias medicinales, es por esto que se profundiza en el tema de los productos naturales, para utilizarlos en el alivio de enfermedades, tanto externas como internas del cuerpo humano, es aquí donde inicia la importancia de la medicina natural o tradicional

La Medicina Tradicional se ha practicado desde los albores de la humanidad a través de tentativas y desaciertos. Es la suma total de conocimientos, técnicas y procedimientos basados en las teorías, las creencias y las experiencias indígenas de diferentes culturas sean o no explicables, utilizadas para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales (Akerle, 1984). (1)

En ese sentido, la medicina tradicional en la actualidad, es ampliamente usada en el mundo; por ejemplo, en África su uso está por encima de 80%, en China alrededor del 40%; mientras que en Asia y América Latina, las poblaciones continúan usando la medicina tradicional, como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales; incluso muchos países desarrollados utilizan más que la medicina tradicional, la medicina complementaria y alternativa así: 75% en Francia, 70% en Canadá, 48% en Australia, 42% en USA y 38% en Bélgica (WHO, 2005). (1)

Históricamente, los productos de origen vegetal, particularmente las plantas medicinales y sus extractos, han pasado de tener un papel de supremacía en el arsenal terapéutico a un discreto segundo plano, para volver a tener, en las dos últimas décadas, una presencia cada vez mayor en la terapéutica. Los remedios a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a proporcionarse entre sí, de forma que, en general, no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas medicinales, todavía no se conocen muchos de los principios activos a los que deben las plantas sus extraordinarias cualidades.



Resaltando la importancia y el uso de las plantas medicinales, en la siguiente investigación, se planteó la necesidad de valorar su calidad; para ello se tuvo en cuenta el uso de herramientas como el análisis microbiológico, que permite detectar la presencia de microorganismos patógenos o de microorganismos que alteren de tal manera, que lo hagan inadecuado para el consumo; De igual manera la determinación de su actividad antimicrobiana por las cuales estas plantas están siendo utilizadas por la población Leonesa. De ahí surge la necesidad de conocer cual es su actividad y su calidad microbiológica de algunos extractos propuestos para este estudio.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la Calidad microbiana en plantas de *Annona muricata*, *Lippia alba*, *Guazuma ulmifolia* **durante los meses de Diciembre 2007 a Abril del 2008.**

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Determinar la actividad Antibacteriana en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* en extractos de *Annona muricata*, *Lippia alba*, *Guazuma ulmifolia*.
2. Determinar el límite microbiano en plantas de *Annona muricata*, *Lippia alba* y *Guazuma ulmifolia*.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuáles son los riesgos de utilizar un medicamento natural que no se le ha realizado un análisis microbiológico, así como comprobar si la actividad antibacteriana es efectiva?



MARCO TEÓRICO

Bioensayos

Se entiende por bioensayo un ensayo en que un tejido, organismo o grupo de organismos vivos se usan como reactivo para determinar la potencia de cualquier sustancia fisiológicamente activa cuya actividad se desconoce (FAO, 1981). Los bioensayos, o pruebas de toxicidad son experimentos que miden el efecto de uno o más contaminantes en una o más especies (Reish y Oshida, 1987), permiten evaluar el grado de toxicidad de una sustancia química, un efluente, un cuerpo de agua, etc., empleando organismos vivos (Esclapos, 1999). Puede determinarse la influencia relativa de cada factor sobre los parámetros biológicos estudiados. Los rangos de variación de los factores considerados pueden ser mayores que los existentes en el ambiente natural, lo que muchas veces facilita el estudio de su modo de acción. También pueden estudiarse combinaciones de dos o más factores, lo que permite revelar la existencia de antagonismos o sinergismos entre ellos. La posibilidad de controlar muchas de las variables hace posible la eliminación de las fluctuaciones propias de las condiciones naturales, que generalmente oscurecen o interfieren con la finalidad principal del estudio llevado a cabo (Rodríguez et al.1995). Las pruebas pueden durar varios periodos de tiempo, pero las de 96 horas son las más comunes. Los individuos son expuestos a concentraciones crecientes del tóxico para determinar cambios en el organismo. En general la muerte es el criterio más utilizado en la prueba de 96 horas. Uno o más controles son utilizados en organismos expuestos a similares condiciones excepto cuando existe falta de disponibilidad del tóxico (Reish y Oshida,1987). Los bioensayos toxicológicos tienen por finalidad determinar las concentraciones de un tóxico dado que ocasionen efectos dañinos o nocivos en un organismo modelo. Estos efectos pueden incluirse en las siguientes categorías:

- ❖ Afectación del término de vida.
- ❖ Alteración de la tasa de crecimiento.
- ❖ Cambios de los parámetros reproductivos (Reish y Oshida, 1987).

Tipos

I- Ensayos de respuesta directa. Bioensayos de toxicidad:

Bioensayos agudos: Cuantifican las concentraciones letales de un xenobiótico a una especie en particular. El valor calculado se denomina concentración letal media (CL_{50}), y representa la concentración que causa la muerte al 50 % de la población experimental, en un tiempo determinado (generalmente 48 o 96 horas) (Esclapos, 1999).

De tipo estático: Se efectúa sin la renovación continua del flujo constante de las diluciones sometidas al ensayo (FAO, 1981).

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



Sin renovación: los organismos se exponen a la misma solución de prueba el tiempo de duración del ensayo (Esclapos, 1999).

Con renovación: los especímenes se someten a una preparación fresca de la misma concentración inicialmente empleada, periódicamente (generalmente cada 24 horas) (Esclapos, 1999). Tal renovación puede ser necesaria cuando importantes sustancias tóxicas se deterioran, o son absorbidas, o se pierden por cualquier otra razón, con suficiente rapidez para influir considerablemente con los resultados del ensayo (FAO, 1981)

De flujo continuo: Circula continuamente una corriente de sustancia de prueba nueva en contacto con los individuos experimentales (Esclapos, 1999). Se realizan con la renovación continua o casi continua de las diluciones sometidas al ensayo, con el fin de mantener casi constantes las concentraciones de las sustancias tóxicas activas (FAO, 1981).

Bioensayos crónicos: Estiman la concentración efecto media (CE_{50}), la cual es la concentración de la sustancia de prueba que causa un efecto al 50% de la población experimental, al cabo de un tiempo determinado; depende del estadio de vida considerado o del ciclo de vida del organismo empleado. Alternativamente, un ensayo definitivo puede utilizarse para estimar el tiempo requerido para producir un efecto al 50% de los organismos (TE_{50}), a una concentración específica (Esclapos, 1999).

Bioestimulación: Se mide la facultad de las aguas residuales o de las sustancias químicas de estimular la multiplicación y el desarrollo de algas, este efecto de eutroficación que frecuentemente se traduce en una superabundancia o proliferación de algas (FAO, 1981)

Bioensayos de repelencia: Trata de medir en el laboratorio las reacciones de escapes de los animales acuáticos frente a un contaminante. Al organismo utilizado (generalmente pez o crustáceo de buen tamaño) se le ofrece la oportunidad de elegir entre aguas "contaminadas" y aguas "limpias" en un tubo o tanque pequeño; el gradiente de interfaz puede ser brusco. Los aparatos y procedimientos miden también, por lo general, cuando existe la atracción hacia el contaminante. Para las especies con motilidad el escapamiento puede ser a veces la respuesta sub letal clave, de naturaleza más sensible y más significativa que el deterioro de la reproducción medido mediante ensayos de toxicidad crónicos. Sin embargo, es particularmente difícil predecir, a partir de estos resultados de laboratorio, lo que ocurrirá en el medio. Las respuestas de escape pueden estar o no relacionadas con la toxicidad del contaminante, en algunos casos los organismos no pueden soportar determinadas concentraciones tóxicas o pueden ser atraídas por ellas (FAO, 1981).

Bioacumulación: Son necesarios para las sustancias que se acumulan en las plantas y animales acuáticos; las grandes concentraciones de sustancias tóxicas en los tejidos pueden causar la muerte, pero el organismo es capaz de acumular durante algún tiempo cantidades menores sin sufrir daño. En este último caso, los depredadores pueden acumular las sustancias en grado tal que resulte nociva para ellos o para los depredadores del nivel tráfico siguiente (FAO, 1981).

II. Ensayos de respuesta indirecta: Ensayos organolépticos: Algunos contaminantes pueden producir olores o sabores desagradables en los organismos acuáticos. El contaminante puede no ser nocivo para

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



el organismo acuático, pero puede ocurrir que el organismo pierda valor económico. El mejor procedimiento consiste en la evaluación por parte de personas experimentadas en bromatología y emplear gran número de catadores diestros (FAO, 1981).

Ensayos de bio estimulación: Los efectos de los nutrientes adicionales pueden ser indirectos, como por ejemplo, la producción de sustancias tóxicas o la desoxigenación del agua debida a la proliferación de algas (FAO, 1981). Los bioensayos se pueden realizar en el laboratorio bajo condiciones controladas o en el campo directamente en el medio natural (Tortorelli y Hernández, 1995).

Los bioensayos de laboratorio pueden ser mono o multi específicos. Los mono específicos son diseñados para obtener información acerca de los efectos de la calidad de agua sobre la supervivencia y aspectos de la estructura y dinámica de una población dada. Los multi específicos pueden ofrecer información sobre el impacto a nivel de una comunidad determinada (Tortorelli y Hernández, 1995). Los bioensayos de campo consisten en la exposición de una o más poblaciones a la acción directa del cuerpo de agua, para ello se utilizan contenedores que permiten mantener la población en estudio en un espacio adecuado, sin afectar su relación con el medio. Estos proponen, principalmente, estudiar los efectos sobre comunidades o poblaciones, sin prestar atención a los mecanismos de acción de los contaminantes a nivel de los individuos en particular (Tortorelli y Hernández, 1995).

Acerca de las buenas prácticas de manufactura de fitofármacos.

Las buenas prácticas de manufactura son pautas universales aplicadas en la producción farmacéutica. Los Fitofármacos no tiene consideraciones especiales, pero existen algunas peculiaridades en el complejo de la producción y del control de calidad de los mismos. (2)

Presentamos un resumen de los aspectos relacionados con el control de calidades consideradas en las pautas adicionales a la buena práctica de manufactura conformada por la Organización Mundial de la Salud (OMS). (2)

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

- Nombre botánico.
- Detalles de la fuente de la planta (lugar de origen, fecha de cosecha, método de cosecha, pesticidas empleados, etc.).
- Parte de la planta utilizada.
- En caso de planta seca, debe especificarse el sistema de secado. Descripción macro y micro morfológica.
- Ensayo de identificación, en el caso que sea posible, de los ingredientes activos o marcadores.
- Evaluación de los componentes de actividad terapéutica conocida o de marcadores.
- Métodos para determinar la posible contaminación con pesticidas y límites aceptables.
- Ensayos para la determinación de contaminación microbiana, incluyendo aflatoxinas e infestación por placas y límites aceptados.
- Ensayos de metales pesados y adulterantes.



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

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

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

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

Por lo cual para este Ensayo se hizo el uso de Hojas (*Lippia alba* y *Annona muricata*) y solo corteza para *Guazuma ulmifolia*.

Buenas Prácticas Agrícolas para Plantas Medicinales.

- Identificación precisa de la materia vegetal.
- Cultivos en condición ajustadas a requerimientos.
- Destrucción de plantas enfermas o muertas.
- Cosecha en el máximo contenido del ingrediente.
- Control de la contaminación en todo momento.
- Procesamiento, lavado y oreada en condiciones asépticas
- Proceso de secado a la brevedad, rápido y homogéneo.
- Envases y almacenamiento adecuado.
- Personal con capacitación en las operaciones.
- Documentación rigurosa de los procesos y actividades.

El material procedente de plantas medicinales tiene normalmente un gran número de bacterias y mohos, con frecuencia provenientes del suelo. Dentro de la gran variedad de bacterias y hongos provenientes de la microflora propia de las plantas, casi siempre predominan las bacterias aerobias formadoras de esporas. Además, las practicas de cultivo manejo y producción, pueden causar contaminación y crecimiento microbiano adicional.

La determinación de *Escherichia coli* y de mohos puede ser un indicativo de la calidad de las técnicas de producción y cosecha así como las del secado.

La Fitoterapia:

Es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico. La fitoterapia debe interpretarse como la utilización terapéutica de productos con una actividad suave o moderada, con márgenes terapéuticos relativamente amplios y que dan lugar a tratamientos menos agresivos. Por tanto la fitoterapia utiliza fitofármacos y principios activos aislados de las plantas. Estos productos deberán ser



convenientemente preparados, dándoles la forma farmacéutica más adecuada para su administración al paciente.

Esta tiene una indiscutida importancia en la medicina actual y la resistencia a su uso es cada vez más sustentada en el desconocimiento que en argumentos provenientes de una buena utilización del método científico.

No obstante, no debemos agrandar ni minimizar los recursos y alcances de la fitoterapia ni de los fitofármacos. Debemos saber reconocer cuál es el lugar de importancia que a la fitoterapia le corresponde en el fármaco terapéutica moderna y este es sin duda aquél para el cual se ha logrado demostrar su utilidad; cada fitofármaco debería tener su importancia de acuerdo a su eficacia y seguridad terapéutica.

Esta nueva categoría terapéutica, los fitofármacos, reúne el conocimiento ancestral, etnobotánico y etnomédico; a estos aspectos, se les suma el moderno conocimiento farmacológico básico y clínico. Manteniendo el uso de la planta medicinal, ahora en forma de extracto estandarizado, y respaldándola con toda la tecnología farmacéutica de la que se dispone en la actualidad, se llega a un producto que no guarda diferencia en su aspecto y calidad con los medicamentos alopáticos tradicionales.

Para cada fitofármaco que busca su entrada al mercado farmacéutico es menester la exigencia y cumplimiento riguroso de numerosos estudios de investigación realizados por diversos grupos e investigadores de las más diversas disciplinas.

Estos estudios van aportando paso a paso las evidencias que aseguran los mecanismos de acción a través de los que se ejerce la acción terapéutica y comprueban su eficacia y seguridad en uso.

Producto Natural

(Medicamento natural, medicina natural, remedio natural, droga natural)

Producto procesado, industrializado y etiquetado al cual se le atribuye cualidades medicinales, que contienen en su formulación ingredientes obtenidos de las plantas, animales, minerales o mezclas de éstos.

Los productos que siendo mezclas tengan incluido un principio activo químico, no son considerados como productos naturales. Los constituyentes de plantas aisladas y químicamente definidos, no se consideran medicamentos herbarios. (Pautas para la evaluación de medicamentos Herbarios, OMS. 1991)

Fitofármaco:

Son medicamentos obtenidos mediante modernas tecnologías de producción industrial y que contienen un extracto estandarizado de una planta que constituye su componente biológicamente activo. Estos medicamentos se producen en vanas formas tales como tabletas, grageas, cápsulas y líquidos.

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



Según el criterio de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) los medicamentos herbarios o fitomedicamentos se define como:

“Productos medicinales acabados y etiquetados cuyos ingredientes activos están formados por partes aéreas o subterráneas de plantas u otro material vegetal, o combinaciones de éstos, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales. Por material vegetal se entienden:

Jugos, resinas, aceites vegetales y cualquier otra sustancia de naturaleza semejante. Los medicamentos herbarios pueden contener excipientes además de los ingredientes activos. Si el material e combina con sustancias activas definidas desde el punto de vista químico, inclusive constituyentes de plantas aislados y químicamente definido, no se consideran medicamentos herbarios.”

A pesar que durante un tiempo los fitofármacos se encontraron en un segundo plano, en las últimas dos décadas han vuelto a tener una mayor presencia en la terapéutica.

Un extracto siempre está constituido por una variedad de compuestos químicos de mayor o menor complejidad y son estos componentes los que interactúan con una gran diversidad de moléculas biológicas que pueden ser receptores de la membrana celular, citoplasmáticos, sistemas transportadores de iones, enzimas, etc. Esta característica determina entonces que los fitofármacos no actúan por fuerzas inexplicables o desconocidas.

Muy por el contrario, está cada vez mas establecido que actúan por las mismas vías que lo hacen los medicamentos llamados convencionales y no pocas veces, a través de varias vías simultáneas, en lo que se denomina acción sinérgica.

Pero para que un extracto de planta alcance la categoría de fitofármaco debe cumplir con una serie exigencias de uniformidad (estandarización) que incluyen los siguientes factores:

- Autenticación de la especie botánica empleada.
- Partes de la planta que son utilizadas.
- Factores ambientales.
- Condiciones de la cosecha.
- Contaminación de ingredientes herbarios.
- Buenas prácticas de manufactura.
- Estandarización de los extractos.
- Bases de comparación de los fitofármacos.

El retorno hacia el uso de los productos de origen natural en la terapéutica se ha visto favorecido por varias razones.

- Las cada vez más numerosas Evidencias de los graves efectos secundarios en fármacos de síntesis.
- El avance químico, farmacológico y clínico del conocimiento en torno a los fitofármacos.
- El desarrollo de nuevas formas de preparación y de administración de los fitofármacos.
- El desarrollo de métodos y técnicas que garantizan un mejor control de calidad.

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



- El aumento de la automedicación ya que los productos fitofármacos son, en general menos peligrosos y por tanto más aptos para la automedicación.

Tomando en cuenta la diversidad de productos de origen natural, que comprende gran variedad de principios activos, es necesario establecer características de: calidad, identidad, pureza y seguridad, que puedan definir la aceptabilidad de los Productos Naturales.

Todo lo anterior tiene la finalidad de salvaguardar la salud de los consumidores y la protección al medio ambiente.

Un parámetro que se utiliza para establecer estas características de pureza, calidad, etc, son los Criterios de Riesgos, este se puede definir como el que determina la toxicidad, contaminación o falta de efectividad de una sustancia, producto, accesorio o insumo; que puede causar daño a la salud, la vida y al medio ambiente, temporal o permanente.

Los productos naturales se deben analizar mediante inspección y ensayos según Criterios de Riesgos:

- 1) Etiquetado: Debe cumplir con la Norma armonizada en Unión Aduanera.
- 2) Descripción
- 3) Empaque/Envase
- 4) Ensayos de Identificación y Pureza:
 - a) Características organolépticas: Color, olor y sabor.
 - b) Características macroscópicas: forma, tamaño, características superficiales, textura y fractura.
 - c) Características microscópicas:
 - i) Análisis histológicos
 - ii) Análisis del polvo (pelos, traqueidas, cristales, fibras, gránulos de almidón).
 - d) Ensayos químicos:
 - i) Índice de acidez
 - ii) Índice de Saponificación
 - iii) Índice de Yodo
 - iv) Pruebas de coloración
 - e) Ensayos de Identificación específica de compuestos.
 - f) Ensayos Físicos
 - i) pH,
 - ii) Humedad,
 - iii) Solubilidad,
 - iv) Grado alcohólico,
 - v) Densidad
 - vi) Desintegración
 - vii) Índice de Refracción
 - viii) Granulometría
 - ix) Homogeneidad y otros.



5) Sustancias extrañas

- a) Sustancias inorgánicas: Cenizas totales o insolubles en ácido que determinan purezas inorgánicas presentes.
- b) Contaminación con insectos, roedores y otros.
- c) Contaminación por plaguicidas y agentes fumigantes DDT (no más de 1ppm); Lindano (no más de 0.5 ppm); órgano clorados y fosforados (no más de 5 ppb) y otros.
- d) Metales pesados: plomo (no más de 1 ppm), Cadmio (no más de 0.1 ppm), mercurio (no más de 0.05ppm), arsénico (no más de 50 ppm) y otros.
- e) Partículas extrañas en suspensión

6) Ensayos microbiológicos:

- a) Límites microbianos
- b) Esterilidad

CLASIFICACIÓN DE FORMAS DE DOSIFICACIÓN

Los productos naturales los podemos encontrar en las siguientes formas:

- Aceites
- Cápsulas
- Cremas
- Elíxires
- Extractos
- Geles
- Jarabes
- Pomadas
- Soluciones oftálmicos
- Soluciones nasales
- Soluciones orales en ampolla
- Soluciones óticas
- Tabletas
- Tinturas
- Tisanas

INSPECCIONES Y ENSAYOS DE ACUERDO A LA FORMA DE DOSIFICACIÓN DEL PRODUCTO NATURAL.

- 1) **FORMAS LÍQUIDAS:** Soluciones, jarabes, gotas, ampollas bebibles, elixires, tinturas, suspensiones y extractos.
 - a) Etiquetado
 - b) Envase o empaque
 - c) Ensayo de identificación y pureza:
 - i) Características organolépticas,

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



- ii) Ensayos de identificación específicos de compuestos.
 - d) Pruebas físicas:
 - i) pH,
 - ii) Contenido alcohólico (elixir),
 - iii) Densidad
 - e) Sustancias extrañas
 - i) Partículas extrañas en suspensión.
 - f) Ensayo microbiológico
 - i) Esterilidad (Productos estériles)
 - ii) Límites microbianos
- 2) **FORMAS SÓLIDAS:** Tabletas, tabletas recubiertas, cápsulas duras y blandas.
- a) Etiquetado
 - b) Envase o empaque
 - c) Descripción
 - d) Ensayo de identificación y pureza
 - i) Características organolépticas
 - ii) Ensayos de Identificación específicos de compuestos.
 - e) Ensayo microbiológico
 - i) Límites microbianos
- 3) **POLVOS Y FRAGMENTOS DE PRODUCTOS NATURALES**
- a) Etiquetado
 - b) Envase o empaque
 - c) Descripción
 - d) Ensayo de Identificación y Pureza
 - i) Características organolépticas
 - ii) Características microscópicas
 - iii) Ensayos de identificación específicos de compuestos
 - e) Pruebas físicas
 - i) Humedad
 - ii) Solubilidad
 - iii) pH en la solución
 - iv) Granulometría
 - f) Sustancias extrañas
 - i) Sustancias inorgánicas
 - ii) Contaminación con insectos, roedores y otros.
 - iii) Contaminación con plaguicidas y agentes fumigantes
 - iv) Metales pesados
 - v) Sustancias inorgánicas
 - g) Ensayos microbiológicos
 - i) Límites microbianos.
- 4) **FORMAS SEMISÓLIDAS:** Ungüentos, pomadas, cremas, geles.



- a) Etiquetado
- b) Empaque o envase
- c) Descripción
- d) Ensayos de identificación y pureza
 - i) Características organolépticas
 - ii) Ensayos de identificación específicos de compuestos
- e) Pruebas físicas
 - i) Densidad
 - ii) pH
 - iii) Homogenidad
- f) Sustancias extrañas
 - i) Partículas extrañas
- g) Ensayos microbiológicos
 - i) Límites microbianos

5) ACEITES ESENCIALES Y FIJOS

- a) Etiquetado
- b) Empaque o envase
- c) Descripción
- d) Ensayos de identificación y pureza
 - i) Características organolépticas
 - ii) Ensayos de identificación específicos de compuestos
- e) Pruebas físicas
 - i) Densidad
 - ii) Índice de refracción
- f) Sustancias extrañas
 - i) Partículas en suspensión
- g) Ensayos microbiológicos
 - i) Límites microbianos

ENSAYO ANTIMICROBIANO

Un número grande de enfermedades en los humanos, animales y planta son causadas por microbios de origen patógeno (bacterias de los hongos y algas). La Infección debido a los hongos y bacterias ha sido una causa mayor de muerte en muchos organismos. Se considera por consiguiente que el descubrimiento de penicilina, antibiótico descubierto por Fleming es uno de los mayores descubrimientos importantes en el mundo. Históricamente muchos de los nuevos antibióticos se aislaron de las fuentes naturales (microbios de la tierra, plantas, etc.). Muchos más fueron sintetizados después y se introdujeron en prácticas clínicas. Es importante el tiempo para cronometrar descubrimiento de nuevos patógenos, y habilidades notables de los microbios para desarrollar resistencia contra el antibiótico usado. El descubrimiento y desarrollo de un nuevo agente antimicrobiano, es por consiguiente la parte fundamental del proceso. La diversidad notable presente de los químicos en muestras biológicas tiene tremendo potencial en la búsqueda de los nuevos agentes del antimicrobiano.



Para preparar extractos de la planta en un ensayo antimicrobiano de prueba (por ejemplo, probando para el antibacteriano y actividad anti fúngica) el material de la planta fresco (o material seco), puede macerarse o puede colarse con agua o en un solvente orgánico. Los ensayos de los antimicrobianos de prueba, pueden llevarse a cabo en estos extractos crudos o después de la separación en fragmentos extensos o los puros compuestos. Un protocolo de bioensayo dirigido recomienda, cuando se usa el extracto crudo a través de varios fragmentos, llegando finalmente a los compuestos activos puros. El cuidado debe tenerse para evitar calor durante la evaporación del solvente del extracto o de varios fragmentos, para prevenir que agentes del antimicrobiano que son termolábiles puedan destruirse. No deben someterse los extractos por consiguiente al autoclave (para la esterilización). La esterilización por filtración de la membrana, también debe evitarse debido a que los compuestos del antimicrobiano pueden pegarse a la superficie de la membrana, dando como resultado un extracto inactivo. Deben tener el cuidado de usar el o los solventes apropiados para determinar la actividad antimicrobiana y que no sea afectada por el solvente al momento de emitir los resultados.

Deben verificarse los pH del extracto o fragmentos, no puede haber crecimiento en medios de cultivos que son excesivamente ácidos o básicos. Es aconsejable llevar acabo el bioensayo de los extractos en un medio neutro (pH 6.0 a pH 8.0).

Generalmente es mejor extraer el material de la planta con 80% EtOH-20% H₂O, al extraer con ambos solventes orgánicos, los compuestos solubles en el solvente orgánico y solubles en agua, son extraídos; el etanol debe quitarse completamente antes de probar la actividad antimicrobiana de la muestra.

No hay ningún solo bioensayo determinado para evaluar la actividad del antimicrobiano de una muestra. Por consiguiente, el proceso de la evaluación generalmente involucra el uso de varios métodos de bioensayos y la comparación cuidadosa de todos los datos para llegar a una conclusión apropiada (Linton, 1983).

Hay tres métodos mayores para la comprobación de la actividad antimicrobiana:

(a) Método de difusión de agar:

Los pozos están cortados en agar sembrado y la muestra de la prueba se introduce directamente en los pozos. El diámetro de la zona, es clara alrededor del anillo y se compara contra las zonas de inhibición producidas por soluciones de concentraciones conocidas de antibióticos normales. En las muestras, donde hay presencia de partícula suspendida (o precipitación de sustancias, agua-insolubles en el disco o cilindro), interfiere con la difusión de la sustancia del antimicrobiano, por lo que al calentar el plato pueden ser ventajoso. Cinco o seis muestras pueden ser probadas simultáneamente por el método de difusión.

(b) Método de dilución de agar:

El medio se inocula con el organismo de prueba y las muestras a prueba se mezclan con el medio inoculado. El material se inocula y el crecimiento de los microorganismos se ve y se compara con una lectura de un estándar que no contenga la muestra de la prueba. El experimento se repite en varias



diluciones con la muestra del material a prueba en el medio de lectura y la dilución más alta, que es la que previene el crecimiento del microorganismo simplemente (MIC) es determinado.

(c) Método del Bioautografo:

Se protege la actividad del antimicrobiano, colocando la muestra del antibacteriano en un cromatograma. El agente del antimicrobiano se transfiere del plato de TLC o cromatograma del papel a un agar inoculado por la difusión y las zonas de inhibición visualizadas.

Es importante mencionar aquí que toda la manipulación del material microbiano debe realizarse en un ambiente que contenga (Cámara laminar o caja del guante) y disponer de guantes quirúrgicos. Esto minimizaría las oportunidades de cualquier infección al personal a cargo del bioensayo o una contaminación en el procedimiento de la prueba.

También es importante que todo el material contaminado sea colocado en bolsas en el autoclave, este debe estar a 120 °C antes de la disposición.

Factores determinantes de la Calidad Microbiológica de los Fitofármacos.

Hay diversos factores que afectan el crecimiento de los microorganismos, entre ellos tenemos:

Intrínsecos:

- Naturaleza de la planta y barreras naturales.
- Estructura de la planta.
- Composición de la planta (compuestos antimicrobianos). Como el **pH**; es muy importante considerar el pH óptimo para el crecimiento de los microorganismos de cada especie, casi todos los microorganismos neutrófilos crecen mejor en un pH de 6 – 8, aunque algunos acidófilos tienen un pH óptimo tan bajo como es de 3 y otros alcalófilos tan altos como de 10.5.
- Contaminación intracelular microbiana.

Extrínsecos:

- Clima:

Uno de los factores es la **Temperatura**; muy importante en el crecimiento de los microorganismos, porque muchas especies microbianas varían ampliamente en la temperatura óptima para su desarrollo:

- ❖ Las formas psicrófilas crecen mejor a temperaturas bajas entre 15 – 20 °C.
- ❖ Las formas mesófilas lo hacen a 30 – 37°C.
- ❖ Las termófilas lo hacen a 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.



- **Humedad:** no solamente aumenta el peso de la droga, reduciendo así el porcentaje de constituyentes, sino que también favorece la actividad enzimática y el desarrollo de hongos.
- Ubicación / Posición

Método de cosecha:

Varía según la droga que se desea obtener y de acuerdo con los requerimientos farmacéuticos de la misma.

Las **cortezas**; se suelen desprender a mano con instrumentos cortantes comunes.

Cuando se trata de **hojas y hierbas**, las plantas cortadas pueden llevarse directamente a los secadores, y después del secado las hojas se separan de las ramas.

- Post cosecha.
- Estado físico.
- Tratamiento tecnológico. Empaque:

Almacenaje: es un factor primordial para mantener la alta calidad de las drogas, se debe procurar un lugar fresco y protegido de roedores, las drogas siempre deben almacenarse a la temperatura más baja posible, porque las temperaturas altas aceleran todas las reacciones químicas, incluso las que provocan el deterioro.

Contaminación bacteriana exógena.

Características de cultivo de las bacterias a identificar en el estudio.

Mesófilos:

Son bacterias patógenas o no patógenas, Aerobias y Anaerobias facultativas, que pueden reproducirse a una temperatura entre 10 y 45°C, teniendo como temperatura óptima de crecimiento de 30-37°C. Estas bacterias son de vida libre y se encuentran en animales de sangre caliente.

Aerobios:

Microorganismo capaz de crecer o metabolizar en presencia de oxígeno libre.

Anaerobios:

Se dice del microorganismo capaz de crecer o de metabolizar en ausencia de oxígeno libre, puede ser facultativo u obligado (es decir morirá en presencia de oxígeno).

Para nuestro estudio resultan de interés las familias:

Enterobacteriaceae, Micrococaceae, Pseudomonadaceae y los Hongos verdaderos

Familia Enterobacteriaceae:

Los microorganismos integrantes de esta familia se distinguen porque en su mayoría habitan en el conducto intestinal del hombre y animales inferiores de ahí su nombre.

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



Son fermentadoras activas de la glucosa y lactosa, reducen los nitratos a nitritos, fácilmente cultivables en una gran variedad de medios, a temperaturas que oscilan entre 25°- 37° C. Las especies móviles Están flageladas de modo peritrico algunos microorganismos de la familia producen pectinasa; evidentemente no se puede utilizar una sola prueba bioquímica, o una propiedad fisiológica única para identificar a cualquier miembro de la familia.

Forma bacilar no esporógena, son gram negativos, aerobios, algunas especies son patógenas primarias peligrosas, que ocasionan fiebre tifoidea, disentería, diarreas infantiles e infecciones del conducto urinario y otros órganos, además existen especies para parásitas de plantas que provocan marchites y podredumbres ligeras.

Los géneros que integran la familia Enterobacteriaceae son: *Escherichia*, *Aerobacter*, *Salmonella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Proteus*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Pectobacterium*.

A continuación describiremos los de nuestro interés:

Género Escherichia.

Es un genero muy esparcido en la naturaleza entre sus especies la mas importante es la *Escherichia coli* que es la especie mas genuinamente fecal, y se encuentra siempre en el conducto intestinal del hombre y de los animales, es por eso que su presencia en los alimentos o en las aguas potables puede ser indicio de contaminación fecal.

La *Escherichia coli* puede causar mas problemas graves al invadir la vejiga urinaria y la pelvis renal produciendo cistitis, y pielitis respectivamente.

Para la identificación de *Escherichia coli* mediante pruebas bioquímicas.

Diferenciación de los coliformes.

Los métodos para proceder a la diferenciación entre los distintos coliformes no son técnicamente difíciles.

Habiendo obtenidos cultivos puros satisfactorios, ya sea con el método estándar ya con el de membrana de filtro, se realizan la pruebas de producción indol, la de la reacción del Rojo de Metilo, la reacción de Voges — Proskauer y la capacidad para utilizar el Citrato Sódico como única fuente de carbono.

Fórmula IMViC = se utiliza a menudo una regla nemotécnica (para ayudar a la memoria), IMViC, con más o menos signos para expresar la diferencias entre los microorganismos coliformes por medio de una formula: La I se refiere a la reacción del Indol; la M a la reacción del Rojo de Metilo; la y , a la prueba de Acetil Metil — Carbonil (prueba de Voges — Proskauer); la i se incluye con finalidad eufónica y la C se refiere al crecimiento en una sola solución mineral que contenga citrato como fuente única de carbono.

Así, un microorganismo del grupo coliforme designado como IMViC +-t---. Seria *Escherichia* puesto que éste da positivas las reacciones del indol y del rojo de metilo, pero negativas las reacciones de Voges Proskauer y del citrato.

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



Género Salmonella.

El género *Salmonella*, consiste en células de forma bacilar habitualmente móviles y capaces de utilizar el citrato como fuente de carbono; la mayoría de estas cepas son aerógenas.

Además uno de los más importantes de la familia reúne muchas especies patógenas que provocan enfermedades tales como: tífus, alteraciones gastrointestinales (*Salmonelosis*), septicemia (invade la sangre), fiebres tifoideas y para tifoideas, etc.

Salmonelosis: enfermedades provocadas por *Salmonellas* que va desde un dolor intestinal leve hasta una enfermedad fatal.

Dentro de las características diferenciales de la *Salmonella* utilizaremos como ejemplo la cepa *Salmonella* Thypi, siendo esta: xilosa variable:

Tehalosa y sulfuro de Hidrógeno positivo; arabinosa, agar citrato y gas en dextrosa, indol negativo.

Familia Micrococaceae:

Las micrococaceas son Gram. Positivas, no formadoras de esporas y principalmente saprofitas que viven libremente, suelen ser esféricas o esferoidales y se dividen típicamente en dos o tres planos, algunas veces formando acúmulos o masas de cocos semejantes a racimos de uvas o bien, grupos aplanados cuadrados de cuatro elementos.

La familia incluye los géneros *Micrococcus*, *sarcinas*, *Staphilococcus*, *Methanococcus* y *Peptococcus*.

Géneros Staphylococcus.

Este género microscópicamente suele confundirse con *Micrococcus*, sus representantes forman masas irregulares, aunque casi siempre se agrupan en racimos. La diferencia entre estos géneros se aprecia en la capacidad que tiene *Staphylococcus* de fermentar o utilizar la glucosa, el manitol y el piruvato en condiciones anaerobias. De ahí se plantea que esta familia agrupa microorganismos aerobios facultativos.

Se encuentra frecuentemente en la piel, membranas, mucosa de nariz y boca, heridas infectadas, etc. Donde aparecen en grandes cantidades Aún en condiciones normales.

Hay dos especies principales: El *Staphylococcus aureus* que se distingue por su pigmento dorado, es notorio como productor de enfermedades supurativas. El *Staphylococcus epidermidis* es menos patógeno o comensal de la piel y de las membranas mucosas.

Dentro de las características diferenciales podemos mencionar las correspondientes al *Staphylococcus epidermidis* las cuales son las siguientes: No fermentan el manitol, ni produce coagulasa, toxina alfa o lipasa; la licuefacción de la gelatina es lenta o no existe; la hemólisis es discreta o ausente.



Familias Pseudomonadaceae:

Son de origen marino y toleran altas concentraciones de sal. Numerosas especies de esta familia producen pigmentos azules, verdes y amarillos solubles en el agua y difusibles; y a veces fluorescentes.

Género Pseudomonas.

Es una bacteria polifórmica gramnegativa, móvil, es un aerobio obligado, se desarrolla a la temperatura óptima de 37° C pero puede crecer incluso a los 40 - 41° C. Sucumbe a 60° C en 1 hora, es sensible a los desinfectantes.

En condiciones naturales la *Pseudomona aeruginosa* habita en el suelo, el agua y las plantas, pero a veces se aísla en los pacientes con quemaduras, así como heridas infectadas y en la uretra.

En el hombre provoca procesos supuradas locales o generalizados: otitis, pielitis, cistitis, queratitis, meningoencefalitis y septicemia, contamina las superficies de las heridas y quemaduras. Los niños menores de edad y debilitados son los más susceptibles a la infección por *Pseudomonas*. En los enfermos afectados por esta bacteria la pus y las vendas se colorean de azul verdoso.

Hongos

Son organismos eucariotes pluricelulares, carecen de clorofila, aerobios obligados y anaerobios facultativos, inmóviles, son quimiotróficos, secretores de enzimas que descomponen gran variedad de sustratos orgánicos para dar nutrientes solubles que después se absorben por la célula mediante transporte activo, cada célula fúngica posee al menos un núcleo, y membrana nuclear, retículo endoplasmico, mitocondria y aparato de golgi; además posee una pared celular rígida formada por capas de carbohidratos, cadenas largas de polisacáridos, glucoproteínas y lípidos; una membrana celular fúngica que contiene esteroides (ergosterol y cimosterol).

Algunos hongos se ordenan en estructura de células múltiples llamados mohos y setas. El crecimiento en forma de moho produce colonias filamentosas multicelulares; las cuales crecen como túbulos cilíndricos ramificados llamados hifas, cuyo diámetro varía de 2-10 μm ; el conjunto de hifas enmarañadas forma el micelio, el cual a su vez puede ser aéreo que se encarga de la multiplicación del hongo y vegetativo, cuya función es de proporcionarle nutrientes al hongo y cumplir con sus actividades biológicas. En los hongos suelen distinguirse dos tipos de hifas, septadas de muchos hongos; tienen numerosos tabiques que separan las células individuales y las hifas aseptadas, tienen un tubo germinal sin tabiques con muchos núcleos. La reproducción de los hongos se realiza por la formación de esporas sexuales o asexuadas. Las esporas asexuadas son las talosporas que se forman directamente en la hifa sin fusión nuclear; las conidias que nacen a partir de conidióforos y esterigma; y las esporangiosporas se forman dentro de estructura llamados esporangios.



Las esporas sexuales se reproducen después de una fusión nuclear; tenemos las oosporas, resultado de la unión de dos gametogios; zigosporas, por la unión de dos hifas, Ascosporas se forman por la unión de dos células en una asca y basidiosporas se forma en una estructura que es basidio.

Los hongos se clasifican de acuerdo a la reproducción sexual y de las esporas que resultan durante la fusión nuclear meiosis o intercambio de reproducción genética, las cuales se dividen en clases cigomicetos, ascomicetos, basidiomicetos, deuteromicetos u hongos imperfectos.

Los hongos crecen en medios de cultivos que contengan carbohidratos como Agar Dextrosa de Sabouraud a una temperatura ambiental (25°C) por 8 días; se observan colonias grandes con aspecto aterciopelados, pulverulentas, algodonosas y con pigmentación en los micelos aéreos y vegetativos. Los hongos saprofitos se encuentran en el medio ambiente, aire, suelo, tierra, agua por el cual nos pueden contaminar y descomponer los productos farmacéuticos, causando en el humano micosis oportunista.

Levaduras

Son células únicas de forma esférica elíptica y cilíndrica, que miden de 3-5 μm de diámetro, anaerobias facultativas, no poseen flagelos y la mayoría se reproduce asexualmente por gemación y fisión binaria.

Algunas especies producen yemas que no se desprenden y se alargan formando cadenas de células alargadas de levaduras denominadas pseudo-hifas.

El protoplasma de una célula de levadura está formado por pared celular, membrana citoplásmica, núcleo, vacuola, numerosos gránulos de carbohidratos y glóbulos de lípidos.

La reproducción sexual de algunas levaduras lo hacen por la formación de ascosporas; por las cuales se clasifican en levaduras falsas que pertenecen a la clase Deuteromicetos, y las verdaderas a la clase Ascomicetos, y se encargan de contaminar y descomponer los productos farmacéuticos especialmente los que contienen azúcares.

Las levaduras se cultivan en medios que contengan azúcares, como el Agar Dextrosa de Sabouraud a una temperatura de 37°C por 24 horas con un pH óptimo de 3 – 7.5, dando colonias grandes cremosas irregulares lisas y rugosas con olor a levadura de pan o a cerveza.

Análisis Microbiológico.

Entendemos por cultivo de microorganismos el proceso que induce su crecimiento. Para cumplir la mayoría de las finalidades de la microbiología, se cultivan en in Vitro (de latín vitrun = vidrio), es decir, en matraces, tubos de ensayo y otros recipientes de vidrio. En la actualidad los frascos de cultivos pueden ser también de plástico o acero.

Para este tipo de cultivo es indispensable la preparación de soluciones, u otras formas de los materiales que los microorganismos pueden utilizar como alimento.

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



Limite Microbiológico:

Conjunto de pruebas cuyo objetivo es evaluar la calidad sanitaria de productos farmacéuticos (materia prima, productos intermedios y terminados) mediante el recuento de organismos mesófilos aerobios, hongos filamentosos y levaduras, así como, la investigación de microorganismos objetables en dichos productos.

Recomendaciones Generales:

- ❖ Las muestras deben de trabajarse bajo condiciones asépticas.
- ❖ El tiempo transcurrido desde la preparación de la primera dilución hasta su incorporación en el medio de cultivo no debe de exceder de una hora.
- ❖ Las muestras de prueba deben de incubarse a 35 ± 2 °C, de 24 a 48 horas, a menos que se especifiquen otras condiciones.
- ❖ En cuanto a las enterobacterias no deben de superar las 1000 unidades por gramo.

La OMS (Organización Mundial de la Salud) recomienda las siguientes especificaciones microbiológicas para productos de origen natural o fitofármacos:

- ❖ Recuento de aerobios mesófilos = $<10^7$ UFC (unidades formadoras de colonias) / g.
- ❖ Recuento de Hongos y Levaduras = $<10^4$ UFC (unidades formadoras de colonias) / g.
- ❖ Recuento de *Escherchia coli* = $<10^2$ UFC (unidades formadoras de colonias) / g.
- ❖ *Salmonella s.* = Ausência.

MUESTREO

La muestra de producto para cada determinación no debe ser menor a 10 gr. Y se peso directamente sin realizar extracto.

PROCEDIMIENTO

De acuerdo a las características físicas de la muestra, elegir el método adecuado para obtener una solución, suspensión o emulsión sin alterar el número y clase de microorganismo.

Los métodos de preparación de la muestra constituyen la primera dilución del producto. Dilución que puede hacerse con solución diluida de fosfatos de pH 7.2, caldo digerido de caseína soya lecitina polisorbato, caldo soya tripticaseina o caldo lactosado.

Cuando se analizan líquidos no miscibles en agua, ungüentos o ceras, es necesario utilizar diluyentes adicionando el polisorbato 250 a concentraciones de 1 al 10%.

Sólidos y líquidos miscibles en agua.

Pesar o medir exactamente 10 gr. O 10 ml de muestra y transferirlo a 90 ml del diluyente seleccionado.

Sólidos insolubles, tabletas y grageas.

Pulverizar la cantidad necesaria de muestra para obtener 10 gr. Y transferir a 90 ml del diluyente seleccionado.

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



Líquidos no miscibles en agua.

Medir exactamente 10 ml de producto, transferirlo a 90 ml del diluyente seleccionado de polisorbato 20.

Ungüentos y ceras.

En un vaso de precipitados estéril, pesar 10 gr. De la muestra, agregar la cantidad mínima necesaria de polisorbato 20 (1 a 10 ml) para que al agitar con una barra magnética estéril se forme una pasta, calentar en un baño de agua a temperatura que no exceda los 45° y agregar gradualmente el volumen necesario para completar 90 ml con el diluyente seleccionado.

Líquidos viscosos.

Para muestras viscosas que no puedan medirse con pipetas en la dilución 1:10, efectuar diluciones 1:100 o 1:500.

Dilución de la muestra.

En función del grado de contaminación del producto efectuar las diluciones decimales que se estimen convenientes. Cuando no se tienen antecedentes al respecto es conveniente efectuar hasta la dilución 10^{-3} y ampliar o reducir el número de diluciones en base a la experiencia. Para obtener la segunda dilución del producto transferir 1 ml de la primera dilución a un tubo conteniendo 9 ml de solución diluida de fosfatos de pH 7.2. Proseguir de igual forma para obtener las siguientes diluciones, utilizando una pipeta para cada dilución e inoculando simultáneamente las placas o tubos con la dilución correspondiente.

Recuento de microorganismos aerobios viables totales:

El recuento de microorganismos aerobios viables totales se determina por el método de filtración a través de membrana, recuento de placa o por el método del número más probable.

El recuento se realiza bajo condiciones que eviten cualquier riesgo de contaminación accidental del producto examinado. Las precauciones tomadas para evitar contaminaciones no deben afectar a ninguno de +los microorganismos cuya presencia puede ser puesta de manifiesto en el ensayo.

Para obtener la cantidad de muestra requerida para el ensayo se mezclan varias porciones seleccionadas al azar de la masa del producto. Según la naturaleza de la muestra que se examine, ésta se diluye, se suspende o se emulsiona en un líquido apropiado.

Se deben utilizar series de diluciones apropiadas a fin de obtener un número de unidades formadoras de colonia que esté dentro de los límites recomendados por el método utilizado.

Método en placa:

Efectuar las diluciones decimales necesarias para que L ml contenga entre 30 y 300 UFC/ml.

Inocular por duplicado L ml de cada dilución del producto, en cajas de petri estériles añadir a cada caja de 15 a 20 ml de agar soya tripticaseina o agar soya tripticaseina – lecitina de soya – polisorbato, previamente esterilizado y mantenido en baño de agua a una temperatura aproximada de 45 a 48° C.

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



Con movimientos suaves rotatorios, mezclar la alícuota de la muestra con el medio de cultivo, evitar derramar el líquido. Permitir que el medio de cultivo solidifique e incubar las placas en posición invertida a 35° C más menos 2° C durante 48 a 72 horas.

Después del periodo de incubación contar el número de UFC, auxiliándose de una lupa. Determinar las UFC de la placa.

Método en tubo:

Colocar 12 tubos conteniendo 9 ml del medio caldo soya tripticaseina, en 4 hileras de tres tubos cada una inocular 1 ml de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} en la primera, segunda y tercera hilera respectivamente. Identificar cada hilera de tubos con la dilución inoculada.

Marcar la cuarta hilera como testigo. Agitar los tubos e incubar a 35° C más menos 2° C durante 48. Después del periodo de incubación anotar el número de tubos de cada dilución con turbiedad debido al crecimiento microbiano.

Repetir la prueba si cualquiera de los tubos testigos muestra desarrollo microbiano.

RECUESTO DE HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS.

En función de la vía de administración del producto, proceder a la investigación de los microorganismos señalados a continuación:

Productos dérmicos, rectales y vaginales:

Pseudomonas aeruginosa y *Staphylococcus aureus*.

Productos orales:

Escherichia coli y *Salmonella sp*

Materias primas:

Dependiendo de la vía de administración del producto investigar los microorganismos señalados, además de *Pseudomonas sp*.

Identificación de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Pesar o medir 10 gr. o ml de muestra y adicionarlo a 90 ml de caldo soya tripticaseina. Mezclar e incubar. Tomar una asada del cultivo anterior y sembrar por estría cruzada en alguno de los siguientes medios: Agar Sal Manitol, Agar Baird – Parker o Agar Vogel Jonson; para el aislamiento de *Staphylococcus aureus* y el medio Agar Cetrinida para *Pseudomonas sp*.

Incubar y preservar la morfología colonial y compararla con las descritas.

Si la morfología colonial y las características bioquímicas no corresponden con la descrita en las tablas, la muestra cumple los requisitos de ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Si las características son similares, realizar las siguientes pruebas:

Confirmación de *Staphylococcus aureus*:

Prueba de coagulasa.

Transferir una porción de la colonia sospechosa a caldo soya Tripticaseina e incubar 245 horas. Colocar 0.1 ml del cultivo en un tubo conteniendo 0.5 ml de plasma fresco de conejo o caballo.



Incubar a 36° C más menos 1° C y observar a las tres horas y subsecuentemente por un período no mayor de 24 horas. Si durante este intervalo no se observa ningún grado de coagulación, la muestra cumple los requerimientos de ausencia de *Staphylococcus aureus*.

Para efectuar la prueba de coagulasa es necesario emplear control positivo y negativo.

Control positivo *Staphylococcus aureus*

Control negativo *Staphylococcus epidermidis*

Confirmación de *Pseudomonas aeruginosa*:

Producción de pigmentos.

Si en el medio Agar Cetrimida se encuentran colonias sospechosas de *Pseudomonas aeruginosa* sembrarlas en los medios Agar *Pseudomonas* para detección de fluoresceína y Agar *Pseudomonas* para detección de pirocianina, incubar a 35° C más menos 2° durante 3 días. Observar las colonias a simple vista y con luz ultravioleta y compararlas con la morfología colonial descrita.

Si la morfología colonial de la tabla corresponde con la obtenida en los medios indicados efectuar la prueba de oxidasa.

Prueba de oxidasa:

Impregnar una tira de papel filtro con una solución al 1% de diclorhidrato de N – Ndimetil p – fenilendiamina y colocar sobre ella una pequeña porción de la colonia sospechosa. La prueba es positiva si se desarrolla un color púrpura en 10 segundos. Emplear como control positivo *Pseudomonas aeruginosa* y como control negativo *Escherichia coli*.

Si es necesario, confirmar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* con pruebas bioquímicas adicionales.

METODO POR DILUCIÓN.

Diluciones Seriadadas:

El método de las diluciones seriadas se emplea extensamente para calcular el número de bacterias en diversos líquidos: agua, leche,

Cultivos etc. En procedimiento típico cantidades de 1 ml de la muestra (Ej: Leche) diluidas en series decimales, duplicadas, cuadruplicadas u otras que puedan convenir se colocan en tubos de caldo nutritivo. Después de incubación de los tubos de caldo se registran los números de los microorganismos observando la presencia o ausencia del crecimiento.

Por ejemplo en una dilución en serie decimal supongamos que se observa crecimiento en el tubo que recibió la dilución 1:1,000 pero no lo hay en el que contiene la dilución 1:10,000. En tal caso, en la muestra de leche examinada existen teóricamente entre 1,000 a 10,000 organismos por mililitros (viable en esa clase de caldo y bajo esa condición ambiental).

Recuento por el Método más Probable:

Se prepara una serie de doce tubo conteniendo en cada tubo de 9 a 10 ml de medio líquido. A cada uno de los primeros tubos se les añade 1 ml del producto diluido, disuelto y homogenizado en la proporción 1:10, como se indicó anteriormente. A cada uno de los tubos siguientes se le añade 1 ml de la dilución 1:100 del producto. A cada uno de siguientes tubos se les añade 1 ml de dilución 1:1,000 del producto

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



y a los últimos de los tubos se les añade 1 ml de diluyente. Se incuban todos los tubos a una temperatura de 30 a 35 grados C durante 5 días al menos. Los 3 últimos tubos no deben presentar crecimiento microbiano. Si por la naturaleza del producto a examinar la lectura de los resultados es difícil o incierta se prepara un sub cultivo en medio líquido o en medio sólido y se procede a la lectura de los resultados después de un nuevo periodo de incubación. Se determina el número más probable de microorganismo por gramos o por mililitro de producto a examinar.

Interpretación de los resultados:

Si se prescribe un límite en una monografía debe interpretarse de la siguiente manera:

10^2 microorganismos — límites Máximo de aceptación 5×10^2

10^3 microorganismos _límites Máximo de aceptación: 5×10^3

Recuento de microorganismos revivificables:

Microorganismos aerobios son aquellos que se desarrollan bajo condiciones aerobias.

El recuento total de microorganismos aerobios, es el índice más comúnmente utilizado para conocer el estado microbiológico de un alimento. Altos recuentos de mesófilos indican materia prima contaminada, condiciones de fabricación poco higiénicas o mal tratamiento térmico.

Altos recuentos totales de microorganismos no patógenos tienen también un significado sanitario. Se considera el recuento total de aerobios como un índice de las condiciones sanitarias de muchos alimentos.

El recuento de bacterias mesófilas aerobias se eleva proporcionalmente en la medida en que se descuidan las condiciones higiénicas en que se obtiene la muestra, se expone esta a diferentes fuentes de contaminación puede ser equipos sucios, el polvo, manipulación inadecuada, etc.

Crecimiento de colonias:

Las células que forman una colonia sobre la superficie de un medio sólido como el agar nutriente, encuentran un ambiente muy distinto del que tienen las células libres bañadas en un medio líquido. A menos que la superficie del medio sólido este muy húmeda o que los microorganismos sean muy móviles, la colonia se ve obligada a crecer en un área muy limitada.

Las limitaciones evidentes a la expansión de las colonias están representadas por los hechos siguientes:

- a. La solución nutritiva puede difundirse solamente en una extensión limitada desde el agar a las sellas superiores de la colonia.
- b. El aporte alimenticio disponible en el agar, en el área inmediata, se agota pronto.
- c. Los productos de desecho no se difunden ni expulsan fácilmente y por consiguiente, se acumulan en la colonia y en el agar subyacente.

Las células situadas en la cima de la masa del cultivo están evidentemente en desventaja y las porciones central y superior de la colonia sufren pronto los efectos del envejecimiento senescencia y otros relativos a la nutrición desfavorable, así como la falta de eliminación de los desechos.

- d. Las colonias demasiado hacinadas compiten entre ellas y unas sobrepasan en crecimiento a las otras.



TINCIÓN DE GRAM

La **tinción de Gram** es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color violeta y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa.

Protocolo

- Recoger muestra
- Hacer el extendido en espiral
- Dejar secar a temperatura ambiente
- Fijar la muestra al calor (flameado 3 veces aprox.)
- Agregar azul violeta (cristal violeta o violeta de genciana) y esperar 1 min. Este tinte dejará de color morado las bacterias Gram positivas.
- Enjuagar con agua.
- Agregar Lugol y esperar 30 segundos
- Enjuagar con agua.
- Agregar alcohol acetona y esperar 15 sg
- Enjuagar con agua.
- Agregar safranina y esperar 1 min Este tinte dejará de color rosado las bacterias Gram negativas.
- Enjuagar con agua.

Para observar al microscopio óptico es conveniente hacerlo a 100x con aceite de inmersión

Técnica de la coloración gram

Fijar un frotis

- Con la ayuda de un mechero, flamear un asa bacteriológica y esperar que enfríe un poco.
- Tomar el asa (previamente flameada) y con ésta tomar un poco de muestra.
- Una vez obtenida una pequeña cantidad de la muestra (con el asa), hacer que ésta tenga contacto con una lámina portaobjetos, la cual servirá para depositar la muestra contenida en el asa.
- Con el asa (conteniendo la muestra) sobre la lámina portaobjetos, proceder a realizar la extensión de la muestra en el portaobjetos mediante movimientos giratorios (dar vueltas con el asa) sobre la lámina, de tal forma que al terminar la extensión, tengamos como producto una espiral en la parte media de la lámina.

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



- Esperar que seque al aire libre o ayudarse con la llama de un mechero para fijar la muestra, teniendo en cuenta que el calor no debe ser directo (sólo se pasa por la llama), puesto que el calor excesivo puede cambiar la morfología celular de las bacterias a observar. El calor deseable es aquél en el que el portaobjetos sea apenas demasiado caliente para ser colocado sobre el dorso de la mano.

Tinción

Con violeta cristal o violeta de genciana, utilizando una cantidad suficiente de dicho colorante sobre la muestra, como para lograr cubrirla por completo. Se deja actuar al colorante por 1 minuto. Esta tinción de 1 minuto está dada para trabajar a una temperatura ambiente de 25 °C.

Enjuague

Al transcurrir el minuto, se debe enjuagar la lámina conteniendo la muestra con agua corriente. Para realizar el lavado, se debe tener en cuenta que el chorro de agua NO debe caer directamente sobre la muestra, ésta debe caer sobre la parte superior de la lámina que no contiene muestra. El chorro debe ser un chorro delgado, aproximadamente de medio a un centímetro de espesor. También el enjuague se debe realizar poniendo la lámina en posición inclinada hacia abajo...

Mordiente

Una vez enjuagado el portaobjetos, se aplica como mordiente yodo o lugol durante 1 minuto más.

El mordiente es cualquier sustancia que forme compuestos insolubles con colorantes y determine su fijación a las bacterias

Decoloración

Pasado el minuto de haber actuado el mordiente, el frotis se decolora con etanol al 75 %, etanol al 95 %, acetona o alcohol-acetona, hasta que ya no escurra más líquido azul. Para esto se utiliza el gotero del frasco del decolorante. Se van añadiendo cantidades suficientes del decolorante, hasta lograr que éste salga totalmente transparente, es decir, hasta que ya no escurra más líquido azul

Lavado y secado

Lavar con agua para quitar los residuos de decolorante y esperar que seque la lámina al aire libre o con la ayuda de la llama de un mechero de la forma anteriormente descrita.

Tinción de contraste

Una vez que la lámina ya secó, procedemos a teñir nuevamente, pero esta vez se va a utilizar un colorante de contraste como por ejemplo la safranina, dejar actuar durante 1 minuto.

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



Nuevo enjuague

Pasado el minuto correspondiente, se procede a enjuagar la lámina con agua, se escurre el agua sobrante y se seca en la forma anteriormente descrita.

De esta manera, ya tendremos listo el frotis para su respectiva observación microscópica.

DETERMINACIONES DE UN ANTIMICROBIANO

Un gran numero de enfermedades en hombres, animales y plantas son causadas por microbios patógenos (bacterias, hongos y algas). Las infecciones por hongos y bacterias ha sido una causa mayor de la muerte en organismos más altos. El descubrimiento de la penicilina, por Fleming es por lo tanto, considerado uno de los descubrimientos importantes en el mundo.

Muchos de los antibióticos nuevos fueron aislados de fuentes naturales (microbios de tierra, las plantas, etc). Otros son de origen sintético posteriores e introducidos en prácticas clínicas.

La lucha desgraciadamente humana contra microbios patogénicos es distante debido a muchas razones. Es muy importante es cronometrar el descubrimiento de nuevos patógenos, y las habilidades notables de microbios a desarrollar la resistencia contra el antibiótico usado. La diversidad notable de sustancias químicas presenta el potencial de la búsqueda de agentes nuevos antimicrobiales.

Para preparar los extractos de la planta de efecto antimicrobiano, (probar la actividad de antibacterial y antifungico), la materia fresca de la planta (o la materia en polvo secada) puede ser macerado o percolado con agua o en un solvente orgánico. Para probar un antimicrobiano, se lleva a cabo en cualquiera de estos extractos crudos o después de la separación en recintos.

Un protocolo dirigido de bioensayo es recomendado cuando la actividad es seguida desde el extracto crudo por varias fracciones, dirigiéndose finalmente a los recintos activos puros. El cuidado debe ser tomado para evitar el calor de la evaporación del solvente o el extracto o de varias fracciones para prevenir que los agentes antimicrobianos labiles a temperaturas puedan ser destruidos. Los extractos deben por lo tanto estar listos (para la esterilización).

Esterilización por filtración de membrana, debe ser evitado también porque los recintos de esterilización pueden atascar la superficie de la membrana, con lo cual la interpretación del extracto daría como resultado inactivo.

Los solventes a ser usados, deben ser probados como control y aceptar que la actividad del antimicrobiano sea normal.

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



El pH del extracto o fracciones, debe ser verificado desde que los microorganismos no son capaces de crecer en medios que son excesivamente ácidos o básicos. Es conveniente hacer los extractos neutros (pH 6.0 al pH 8.0) antes de probar.

Generalmente la mejor forma de extraer la materia de la planta a utilizar en el Bioensayo es utilizando como solvente Etanol – agua en proporción de 80:20, respectivamente El etanol debe ser quitado completamente antes de probar la actividad de antimicrobiano.

Por lo tanto, el proceso de la evaluación implica generalmente el uso de varios métodos de bioensayo y comparación cuidadosa de los datos, llegando a una conclusión apropiada (Linton, 1983).

Hay tres métodos mayores para probar un antimicrobiano:

1.-De difusión Agar-agar.

Los pozos son cortados en el agar-agar, la muestra de la prueba es introducida directamente en estos pozos. Después de la incubación el diámetro de la zona, es claro alrededor del pozo, este es medido y comparado contra zonas de la inhibición producida por soluciones de concentraciones conocidas de antibióticos uniforme.

En las muestras donde la presencia de la materia suspendida de la partícula (o la precipitación de sustancias insolubles de agua en el disco o el cilindro) interviene con la difusión de la sustancia de antimicrobiana, mitigar en un plato de hoyo puede ser ventajoso.

Cinco o seis muestras pueden ser probadas simultáneamente por el método de difusión.

2. En el método de la dilución de agar-agar, el medio es inoculado con el organismo de la prueba y las muestras al ser probado son mezclado con el medio de inoculado. La materia es inoculada y el crecimiento de los microorganismos es considerado, pudiendo comparar con un adelanto del control que no contiene la muestra de la prueba. El experimento es repetido en varias diluciones de la muestra de la prueba en el medio del adelanto y la dilución más alta en que la muestra previene apenas el crecimiento del microorganismo (MIC) es determinado.

El aquilatamiento de la difusión de agar-agar compone de los pasos siguientes:

1. 10 alícuotas de ml de caldo de alimento nutritivo es inoculado con (él prueba los organismos incubado en 37 ° C para 24 hora.

2. Usando un pipeta estéril, 0.6 ml de la cultura de caldo del organismo de la prueba es añadido a 60 ml de agar-agar fundido que ha sido refrescado a 45° C, mixto bien y vertido en un plato estéril de Petri (para el 9 cm plato de Petri, 0.2 ml de la cultura es añadido a 20 ml de agar-agar). Los platos del duplicado de cada organismo son preparados.

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



3. El agar-agar es permitido que endurezca para posteriormente rayar en forma zigzag.
4. Usando una pipeta de 0.1 ml, colocar 100ml de la muestra de la prueba disuelta en un solvente apropiado, es vertido en tubos de ensayos apropiadamente marcados (éstos son marcado al final de la copa antes de llenar). Las mismas concentraciones de los agentes uniformes de antimicrobianos (estreptomicina 1 mg/ml y ampicilina 10 g/ml) y el solvente (como control) son usados.
5. Los platos son dejados a temperatura de la habitación por 2 horas. Permitiendo la difusión de la cara de la muestra e incubado hacia arriba a 37 °C por 24 horas.
6. El diámetro de las zonas de la inhibición es medido al más cercano mm (el tamaño de copa ser notado también) (Kavanagh, 1963; al de et de Leven., 1979).

Las Materias del aquilatamiento de la dilución de agar-agar

Materiales:

Prueba de bacterias tal como: *Bacilo subtilis*, *Estafilococo aureus*, *Estafilococo faecalis*, *Escherichia coli*, *Estafilococo tumefaciens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, etc.

Los pasos de la dilución de agar-agar son:

1. 37 ± 1 ° C para 24 horas.
2. El caldo fresco (20 m) es sembrado, el método de serie de la dilución es seguido como esta descrito abajo. La muestra de la prueba es disuelta en el agua (en caso de soluble en agua) o en un solvente orgánico (etanol o acetona) obtener 10 mg por ml de la solución. Una solución de 0.2 ml de la materia de la prueba es añadido a 1.8 ml del caldo sembrado y este desde la primera dilución.
3. 1 ml de esta dilución es diluido además con 1 ml del caldo sembrado y se produce la segunda dilución, el proceso es repetido hasta que seis diluciones son obtenidas.
4. Un conjunto de tubos deben contener caldo sembrado y el solvente, como control.
5. Después que la incubación por 24 horas en 37 ± 1 ° C el tubo sin el crecimiento visible del microorganismo es tomado y representará la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la muestra de la prueba que es expresado en el mg/m

3-El método de Bioautografo.

El Método del Bioautografo puede ser empleado como un método para localizar la actividad de anti bacterial en un cromatograma. La técnica de la difusión de agar-agar implica la transferencia del

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



recinto de antibacterial del plato de cromatográfico a un plato del agar-agar del inoculado por la difusión, y por la imagen mental de las zonas de la inhibición. Una versión más sencilla mejorada de este método, que evita el equipo extenso de microbiológica y problemas asociados con la difusión de diferencial de recintos del cromatograma al plato del agar-agar. En este método una suspensión de un microorganismo en un caldo adecuado es aplicada al plato del TLC que es entonces incubado en una atmósfera húmeda que permite el crecimiento de las bacterias.

Es importante mencionar aquí que toda manipulación de la materia del microorganismo debe ser realizado en un ambiente apropiado (la cámara del flujo de Laminar o caja de guante) con disponibles guantes quirúrgicos. Esto aminoraría las oportunidades de cualquier infección al trabajador o la contaminación en el procedimiento de la prueba.

Las zonas de la inhibición entonces son representadas por un Reactivo para distinguir la actividad de la deshidrogenasa, una sal de Tetrazolum que es convertido por las bacterias en un color intensamente en el producto. Los recintos de antibacterial aparecen los lugares como sin color contra un color en el fondo.

. De dilución de agar-agar de método de fusión.

PLANTAS MEDICINALES

Nombre científico: *Guazuma ulmifolia*:

Familia: Caesalpinaceae

Nombre común: Guapinol

Descripción botánica: Árbol de hermoso aspecto frondoso. Crece hasta unos 15 mt. Hojas alternas bifoliadas opuestas y lustrosas. Flores grandes, hasta de 5 cm. en racimos, 5 pétalos blancos. Fruto leñoso de 12 a 15 cm., oblongo aplastado, color café rojizo. Contiene de 4 a 5 semillas rojas redondeadas, envueltas en una masa o pulpa seca de color amarillento y sabor dulce, comestible.

Usos endomédicos: El cocimiento de la corteza y la raíz se ingiere para combatir las hemorroides y la disentería. El cocimiento de las hojas y la corteza aplicado exteriormente se emplea en quemaduras, úlceras de la piel, para estimular el crecimiento del cabello cuando ha sido maltratado, y para úlceras del cuello de la matriz.

Sirve para aliviar las infecciones de los riñones, para la próstata y para revitalizar

Nombre científico: *Lippia alba*

Nombre común: Juanislama

Familia: Verbenáceae

Descripción botánica: Arbusto aromático que se ramifica desde la base, y alcanza de 1 a 2 m. Hojas de aspecto y color similares a del orégano, oblongas, dentadas en el borde. Su flor es de color rosado – blanquecino. Crece espontáneamente en jardines o lotes baldíos.

Usos endomédicos: La infusión de las hojas y las flores sirve para calmar los cólicos y producir sudoración. Se emplea como mucho éxito como sedante y anti espasmódico en afecciones

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



gastrointestinales. Eficaz en el tratamiento de úlceras pépticas, colitis, gastritis y problemas irritantes del sistema digestivo.

Nombre científico: *Annona muricata*

Nombre común: Guanábana

Familia: Anonáceas

Descripción botánica: Árbol pequeño que llega a alcanzar hasta 10 metros de altura, de follaje compacto, hojas simples, coriáceas verde oscuro, grandes y brillantes; flores bisexuales solitarias o en pares en tallos cortos que brotan de las ramas viejas; cáliz con 3 sépalos diminutos e inconspicuos de color verde; corola con 6 pétalos de color amarillo; fruto baya colectiva o sin carpo, de forma acorazonada u ovoide, con pericarpio (cáscara) verdoso con tubérculos espiniformes carnosos, la pulpa es blanca y jugosa de sabor agridulce; las semillas de color negro lustroso o castaño. Por su aspecto, el fruto es semejante a la chirimoya, especie del mismo género (*A. cherimolia*). **Usos**

endomédicos: Anticancerígeno: Hojas y brotes tiernos

Antibacteriana: Corteza

Antiparásito: Semillas y corteza

Antiulceroso: Corteza

Galactogogo: Fruto

Antiespasmódico: Hojas

Sedativo: Hojas

Antimalárico: Hojas

Antidiabético: Hojas

Vasodilatador: Hojas

Pectoral: Flores

Amebicida: Corteza

Vermífugo: Corteza y hojas

Insecticida: Hojas y raíz.



DISEÑO METODOLOGICO

TIPO DE ESTUDIO:

El presente estudio es de tipo experimental.

AREA DE ESTUDIO:

Este estudio es realizado en el área de control Microbiológico del departamento de drogas, medicamentos y tóxicos de la Carrera de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas, de la UNAN - León

UNIVERSO:

Plantas medicinales, utilizadas para tratar enfermedades bacterianas que se venden en los centros naturistas de León.

MUESTRA:

3 Especies de plantas medicinales: *Annona muricata*, *Lippia alba*, *Guazuma ulmifolia*.

VARIABLES DE ESTUDIO:

1. Limite Microbiano.
2. Bioensayo Antimicrobiano

FUENTE DE INFORMACION:

Fuente Primaria: Se realizó un cuestionario con preguntas abiertas a los dueños de las Farmacias Botánicas

Fuentes Secundarias: Se hizo una recopilación de la información a través del Internet, Libros y Monografías

PROCEDIMIENTO:

Para el desarrollo del estudio se procedió a la realización de encuesta con pregunta abiertas a los dependientes de las farmacias botánicas de León para obtener las tres plantas de estudio además de revisión bibliográfica sobre las diferentes especies utilizadas para este fin y que probablemente tengan poder antimicrobiano.

De las Farmacias botánicas de la ciudad de León, se procedió a recolectar las diferentes especies y seguidamente la preparación de los extractos y su posterior análisis.

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO POR EL MÉTODO DE MACERACIÓN

- Seleccionar la parte de la planta a utilizar.
- Lavarlas con suficiente agua y jabón.
- Fraccionar en pequeñas porciones y pesar 100g de la materia prima.

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



Extracción por el Método de Maceración

Fraccionar la muestra a utilizar de cada una de las plantas en estudio, pesar 100g, triturarlo y dejar en reposo durante 5 días con 250 mL de alcohol etílico a 80 G.L, en frascos de vidrio ámbar. Luego transcurrido ese tiempo filtrar.

El extracto obtenido tiene una concentración de 40% de materia vegetal

$$\frac{100\text{g de la muestra}}{250\text{mL alcohol etílico}} \times 100\% = 40\%$$

Análisis Microbiológico.

Los métodos microbiológicos se basan en la estimación del número de microorganismos mesofílicos aerobios viables, hongos y levaduras, detección de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudonoma aeruginosa* presentes en el producto farmacéutico.

Recuento Total de Bacterias Mesófilas Aeróbicas. (Método de Placa Vertida)

Del producto farmacéutico se toma 10 g. de la muestra y se coloca en un erlenmeyer que contenga 90 mL de solución buffer fosfato monobásico potásico PH 7.2, mezclar. (dilución 1:10).

De la dilución 1:10 se coloca 1mL en un tubo que contenga 9mL de solución fosfato monobásico potásico PH 7.2, mezclar. (dilución 1:100).

De la dilución 1:100 se toma 1mL y se coloca en un tubo que contenga 9mL de solución fosfato monobásico potásico PH 7.2, mezclar. (dilución 1:1000).

De la dilución 1:1000 se toma 1mL y se coloca en un tubo que contenga 9mL de solución fosfato monobásico potásico PH 7.2, mezclar. (dilución 1:10000).

De la dilución 1:10000 se toma 1mL y se coloca en un tubo que contenga 9mL de solución fosfato monobásico potásico PH 7.2, mezclar. (dilución 1:100000).

De la dilución 1:100000 se toma 1mL y se coloca en un tubo que contenga 9mL de solución fosfato monobásico potásico PH 7.2, mezclar. (dilución 1:1000000).

De las diluciones 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 y 1:1000000 tomar alícuotas en triplicado 1.0mL, y colocarlos en cajas de petri estériles.

Agregar aproximadamente 15 - 20mL, de agar para conteo en placas (Tryptica Soya y Caseina) a una temperatura de 45°C, mezclar cuidadosamente por movimientos rotativos y dejar solidificar.

Incubar a 37°C por 24 horas.

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



Para el recuento total de UFC, se escoge una placa que contenga entre 30 a 300 colonias. El número de colonias, se multiplica por la dilución de la muestra, el cual nos dará las unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de muestra.

Recuento Total de Hongos y Levaduras. (Método de la Placa Vertida)

De las diluciones 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 y 1:1000000 se toman alícuotas por triplicado de 1mL, se colocan en cajas de petri estériles, agregándole de 15 a 20mL de agar Sabouroud a 45°C, mezclar con movimientos rotatorio y dejar solidificar.

Encubar placas a temperatura ambiente (22.5° C±2.5°C) por 8 días para el crecimiento de hongos.

En las placas se observa el crecimiento de colonias medianas o grandes, rugosas con bordes irregulares y cremosos.

PROCEDIMIENTO DE BIOENSAYO

- 1- Obtención de los extractos, se pesaron 100 gr. De cada muestra, y se macero a una relación de 80:20 Etanol – Agua.
- 2- Se dejó reposar por 5 días.
- 3- Se evaporó por medio de baño María hasta su secado total.
- 4- Se pesó 0.5, 1, 1.25, 1.50, 1.75, 2, y 3 mg respectivamente por triplicado.
- 5- Se disolvió cada mg de la muestra en 1 ml de DMSO vertiéndolo a su vez en un tubo de ensayo.
- 6- Se procedió a extraer de cada tubo de ensayo la cantidad en ml de cada una de las concentraciones haciendo uso de pipetas de 5 ml colocándolas en las placas petri.
- 7- Adicionar 15 ml de Agar Trypticaseína soya en cada placa petri.
- 8- Dejar reposar por 2 horas para solidificar el Agar.
- 9- Con un hisopo previamente esterilizado rayar cada una de las placas con los diferentes microorganismos de prueba (*Klebsiella neumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Estaphilococcus aureus*)
- 10- Incubar las placas petri de forma invertida a 37°C por 24 horas.
- 11- Lectura de resultados.



MATERIAL Y EQUIPO

Cristalería: Placas petri, tubos de ensayos, beakers, probeta y termómetro

Equipo de Laboratorio

Equipo	Marca	Modelo
Cocina eléctrica	Corning	P.C.100
Mechero	Fisher	1201-21
Incubadora	Doble marca	Precisión
Refrigeradora	General electric	T.B.F. 12 DM
Embudo		
Asa de Henle		
Horno	Precisión	368 A.
Gradilla Metálica		
Pana de Baño maría		
Espectrofotómetro	Busch & Lomb.	Serie nº 0617622E
Espátula		
Contador de colonias	Québec	3325
Auto clave	Vernitron Medical Products. Inc	Nº 8020
Agitador Eléctrico	Vortex	K – 5506
Baño maría		G/C

MATERIAL DESCARTABLE

Algodón, aplicadores, papel de aluminio, papel filtro, bolsas plásticas

Equipo de protección:

Gabacha, guantes, gorro, gafas, naso bucos.

Cepas:

Pseudomona aeruginosa, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella*



RESULTADOS

LIMITE MICROBIANO Bacterias Aeróbicas Mesófilas U.F.C./gr.

GUANABANA: *Annona muricata*

Métodos	Resultados			Límites Microbianos Aceptables (UFC) según la OMS
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	
Recuento total de bacterias mesófilas aeróbicas.	22 UFC	4 UFC	2 UFC	< 10 ⁷ UFC
Recuento total de hongos y levaduras	< 10 ⁴ UFC			
Detección de <i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente			Ausente
Detección de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente			Ausente
Detección de <i>Salmonella sp.</i>	Ausente			Ausente
Detección de <i>Escherichia coli</i>	Ausente			Ausente

GUAPINOL: *Guazuma ulmifolia*

Métodos	Resultados			Límites Microbianos Aceptables (UFC) Según la OMS
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	
Recuento total de bacterias mesófilas aeróbicas.	338 UFC	43 UFC	32 UFC	< 10 ⁷ UFC
Recuento total de hongos y levaduras	< 10 ⁴ UFC			
Detección de <i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente			Ausente
Detección de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente			Ausente
Detección de <i>Salmonella sp.</i>	Ausente			Ausente
Detección de <i>Escherichia coli</i>	Ausente			Ausente



JUANISLAMA: *Lippia alba*

Métodos	Resultados			Límites Microbianos Aceptables (UFC) Según la OMS
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	
Recuento total de bacterias mesófilas aeróbicas.	8 UFC	4 UFC	2 UFC	< 10 ⁷ UFC
Recuento total de hongos y levaduras	< 10 ⁴ UFC			
Detección de <i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente			Ausente
Detección de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente			Ausente
Detección de <i>Salmonella sp.</i>	Ausente			Ausente
Detección de <i>Escherichia coli</i>	Ausente			Ausente

RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

GUANABANA: *Annona muricata*

Microorganismos de Prueba	<i>S. aureus</i>	Standard Ciprofloxacina	<i>K. pneumoniae</i>	Standard Ciprofloxacina	<i>P. aeruginosa</i>	Standard Ciprofloxacina
Medio de Cultivo	AGAR TRIFITCASEINA Y SOYA					
Cantidad del Extracto						
0.5 mg	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento
1 mg	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento
1.25 mg	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento
1.5 mg	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento
1.75 mg	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento
2 mg	Hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento
3 mg	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento



GUAPINOL: *Guazuma ulmifolia*

Microorganismos de Prueba	<i>S. aureus</i>	Standard Ciprofloxacina	<i>K. pneumoniae</i>	Standard Ciprofloxacina	<i>P. aeruginosa</i>	Standard Ciprofloxacina
Medio de Cultivo	AGAR TRIPTICASEINA Y SOYA					
Cantidad del Extracto						
0.5 mg	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento
1 mg	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento
1.25 mg	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento
1.5 mg	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento
1.75 mg	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento
2 mg	Hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento
3 mg	Hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento

JUANISLAMA: *Lippia alba*

Microorganismos de Prueba	<i>S. aureus</i>	Standard Ciprofloxacina	<i>K. pneumoniae</i>	Standard Ciprofloxacina	<i>P. aeruginosa</i>	Standard Ciprofloxacina
Medio de Cultivo	AGAR TRIPTICASEINA Y SOYA					
Cantidad del Extracto						
0.5 mg	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento
1 mg	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento
1.25 mg	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento
1.5 mg	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay Crecimiento	No hay crecimiento
1.75 mg	Hay Crecimiento	No hay crecimiento	Hay crecimiento	No hay crecimiento	Hay crecimiento	No hay crecimiento
2 mg	Hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento
3 mg	Hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento



CONCLUSIÓN

En los resultados obtenidos en el limite microbiano especifico para identificación de *Escherichia coli* reporta ausencia de la misma pero presenta pigmentación incolora con colonias aplanadas, por lo que se procedió a identificar el microorganismo por medio de la tinción de Gram, y se identifico que es un Bacilos esporulado Gram positivo con esporas terminales spp. Lo que puede ser causa de contaminación ambiental.

Después de realizar la determinación de la actividad antibacteriana y el límite microbiológico de las plantas en estudio concluimos que:

- ❖ Son aptas para el consumo humano de acuerdo al limite microbiológico, dado que cumple con las especificaciones establecidas para fitofarmacos en la farmacopea de la Organización Mundial de la Salud.
- ❖ Las concentraciones en donde se encontró actividad antibacteriana son concentraciones altas por lo cual para la utilización de esta planta con fines antimicrobianos debe de ser utilizada en grandes cantidades.
- ❖ Son productos seguros ya que cumplieron con los parámetros establecidos.
- ❖ Se demostró que la guanabana y la Juanislama poseen actividad antibacteriana a concentraciones de 2 y 3 mg para *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa* y en 3 mg para *Staphylococcus aureus* en el caso de la Guanábana. El guapinol solamente presento actividad a concentraciones de 2 y 3 mg en *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.



RECOMENDACIONES

- Recomendamos que se realicen nuevos estudios con estas plantas ya que su actividad antibacteriana tiene efecto a altas concentraciones y es necesario realizar el estudio para determinar la toxicidad de los fitofarmacos en estudio.
- Debido a que los fitofarmacos analizados, no contaban con la cantidad exacta del peso de la planta que se comercializa, es importante contar con un ente regulador de productos a base de plantas medicinales para que estos cumplan con todos los parámetros de calidad.
- Se debe tener presente que todo fitofarmaco debe ser considerado como un medicamento al que hay que exigirle el cumplimiento de los parámetros propios de los mismos como son: Calidad, Seguridad y Eficacia.



BIBLIOGRAFIA

1. Arguello Gallo Nadia Rene et-al. Análisis Microbiológico de Fitofármacos no obligatoriamente estériles elaborados por el laboratorio ECOLIFE.
2. Benigni, R; Capra, C; Cattorini, P. Piante Medicinali. Chimica, Farmacologia e Terapia. Milano: Inverni & Della Beffa, 1962, pp. 333-8.
3. Bézanger-Beauquesne, L; Pinkas, M; Torck, M. Les Plantes dans. La Therapeutique Moderne. 2^a. Paris: Maloine, 1986, p. 199.
4. Curry.,A. S.,G.G., Joyce, and G.N. Mc Ewwn,Jr. 1993. CTFA Microbiology guidelines. The cosmetic,Toiletry and Fragance . Association. Inc. Washington,DC.
5. Collins C.H, Lyne Patricia, Métodos Microbiológicos Edición Acribia, S.A, Zaragoza, España, quinta edición.
6. Cappuccino G. James, Sherman Natalie, Microbiology A Laboratory, Edición Benjamín/ Cummings, New York, quinta edición.
7. Leavit., J.M. Naidorf and P. Shugaefsky. 1955. The undetected anaerobe in endodontic, a sensitive medium for detection of both aerobes and anaerobes. The NY.J. Dentist. 25:377-382
8. Manual de Microbiología y Parasitología, 2006
9. Muñoz Jarquin Jacqueline del Socorro; et-al. Análisis bacteriológico en infusiones de 7 plantas medicinales expandidas en los centros naturistas de los municipios de León y Chinandega.
10. Pino-Benítez / Revista Latinoamericana de Recursos Naturales, 2 (1): 33-44, 2006. Botánica y screening fitoquímico de doce plantas usadas en medicina tradicional en el Departamento del Chocó, Colombia
11. Salvat Básico, Diccionario Enciclopédico, Edición Carvajal S.A., tercera reimpresión, 1988.
12. TORRES ROJAS, Mausy Lorena, ARIAS PALACIOS, Janeth, GUATIBONZA, Fernando *et al*. Análisis microbiológico de plantas medicinales. *Rev Cubana Farm*, maio-ago. 2007, vol.41, no.2, p.0-0. ISSN 0034-7515
13. The United States Pharmacopeia. 1995. Microbiological test, p. 168-1686. The United States pharmacopeia, 23nd Ed.United States Pharmacopeis, Conveton. Rockesville, MD.
14. Apuntes de Bioensayos.htm
15. www.biocen.cu/producto/indicemc/Imcp3.htm
16. <http://www.lablinsan.cl/productos/page20.html>
17. <http://www.lablinsan.cl/productos/page35.html>
18. **XXIV REUNIÓN UNIÓN ADUANERA GUATEMALA, GUATEMALA SUB GRUPO DE MEDICAMENTOS LABORATORIO 15 DE ABRIL 2004**



Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León.
Determinación anti microbiana y Limite Microbiológico de *Annona Muricata*, *Lippia alba*, *Guazuma ulmifolia*. *ulmifolia*

ANEXOS

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



REACTIVOS UTILIZADOS

Identificación de la sustancia/preparado y de la sociedad o empresa

Uso de la sustancia o preparado:

Para usos de laboratorio, análisis, investigación y química fina.

Composición

Denominación: Dimetilsulfóxido

Fórmula: C_2H_6OS M.=78,13 CAS [67-68-5]

El dimetil sulfóxido (dimetilsulfóxido, DMSO, CH_3SOCH_3) es un líquido orgánico sin color que contiene sulfuro, usado como solvente orgánico industrial a partir de 1940, como criopreservante a partir de 1961 y como un medicamento (reduce el dolor y la inflamación).

Por su propiedad de atravesar rápidamente la epidermis y las membranas celulares el DMSO sirven también como acarreador de drogas o venenos.

Descubierto por Saytzeff en 1866, el dimetilsulfóxido se obtiene como subproducto durante el procesamiento de pulpa de madera para la fabricación de papel.

Es un solvente aprótico y altamente bipolar. Por ello, es miscible tanto con el agua como con solventes orgánicos como alcoholes, cetonas etc. Puede formar complejos en sistemas biológicos.

AGAR

El agar, o agar -agar, es un polisacárido que se obtiene de algas del género *Gelidium*, algas que se han utilizado en la cocina tradicional japonesa, por sus propiedades gelificantes-, desde hace muchos siglos. También se obtiene de otras algas, entre ellas especies de los géneros *Gracillaria* de las que procede actualmente la mayoría del agar, y de *Gelidiella* y *Pterocladia*, que aportan pequeñas cantidades. El agar de mejor calidad se obtiene de *Gelidium*, aunque en los últimos años se ha extendido mucho la obtención a partir de cultivos marinos de *Gracillaria*, que son ahora la fuente principal de este polisacárido. En España se obtiene sobre todo de *Gelidium corneum*. En el listado de aditivos alimentarios de la Unión Europea, el agar es el E-406

El agar como tal se descubrió accidentalmente, junto con el método de obtención que todavía se utiliza, la congelación y descongelación de sus geles, a mediados del siglo XVII. El nombre tradicional japonés para este producto es "kanten". La palabra "agar", o "agar-agar", que se utiliza actualmente, procede del malayo, y hace referencia a otro gel distinto, el obtenido tradicionalmente en esa zona a partir de *Eucaema muricatum*. En el siglo XIX, los emigrantes chinos llevaron a Malasia el producto japonés, adaptando a él el nombre local del gel de algas. Cuando el kanten japonés pasó a Europa, lo hizo con el nombre malayo de agar.



Estructura

El agar se considera formado por la mezcla de dos tipos de polisacáridos, la agarosa y la agarpectina. La agarosa es el componente principal, representando alrededor del 70% del total. Tanto la agarosa como la agarpectina tienen la misma estructura básica.

El agar es un polisacárido no digerible, que desde el punto de vista nutricional forma parte de la "fibra". Las enzimas capaces de degradar el agar son extraordinariamente raras, incluso entre los microorganismos. Por eso el agar es también un valioso medio de cultivo en bacteriología, utilizándose en esta aplicación desde la década de 1880.

AGAR TRIPTICASEINA SOYA

ESPECIFICACIONES

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.

Peptona de Caseína 15.0

Peptona de Soya 5.0

Cloruro de Sodio 5.0

Agar Bacteriológico 15.0

pH 7.3 ± 0.2

Método:

Suspender 40gr 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 $45-50^{\circ} \text{C}$ y vaciar en placas de Petri estériles. Para preparar Agar Sangre, adicionar asepticamente sangre desfibrinada estéril al 5% después de esterilizar y enfriar el medio.



Agar-Agar: Sustancia mucilaginososa que se extrae de algunas algas rojas o Rodofíceas, frecuentes en el Océano Atlántico, Pacífico e Indico. Es una sustancia amorfa. Se emplea como medio de cultivo en bacteriología, como apresto de sedas, como sustituto de la gelatina, etc.

La forma seca del Agar-Agar se conoce de mediados del siglo XVIII, cuando un japonés descubrió, accidentalmente, la manera de purificarlo y secarlo. Fue llevado de China a Europa y traído a América a mediados del siglo XIX, para utilizarse, principalmente, como sustituto de la gelatina en la confección de postres gelatinosos.

Químicamente, el Agar-Agar es una mezcla compleja de sales de polisacáridos, fundamentalmente, galactósidos. Las grandes moléculas que lo constituyen determinan sus cualidades sobresalientes, como coloides y espesantes, que lo han hecho hasta ahora insustituible.

Además de los polisacáridos, el Agar-Agar contiene numerosos cationes asociados, tales como sodio, potasio, calcio, magnesio, etc. De los cuales no está, claramente, establecida su influencia sobre las propiedades de este producto.

Referente a las propiedades y contenidos del Agar-Agar, básicamente, dependen de la materia prima empleada, procedencia geográfica, época de cosecha y madurez del alga.

A continuación, se caracterizarán los tipos de medios de cultivo según su estado y composición.

Estado:

Medios sólidos: Su proporción de Agar es siempre por encima del 15%.

Medios semisólidos: Son medios intermedios entre los medios líquidos y sólidos, su proporción de Agar suele ser inferior al 5%, pero siempre suele presentar cierta cantidad que le proporcione una consistencia semisólida.

Medios líquidos o caldos: No contiene Agar y su composición (además de agua) suele contener al menos una fuente de carbono, sales minerales, y a veces según las características de medio, factores de crecimiento, vitaminas, peptonas, aminoácidos, entre otros.

Composición:

Medios sintéticos o químicamente definidos: Llevan fuentes de carbono, nitrógeno, sales que suplan iones (P, K, Mg, Fe, Ca, etc.), otros elementos como estimuladores de crecimiento pero siempre a concentraciones conocidas.

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



Medios complejos o de composición indefinida: Estos medios llevan ingredientes como extracto de levadura, peptona, infusión de cerebro, extracto de carne, etc. que contienen nutrientes en abundancia pero sin saber con exactitud la composición cualitativa ni cuantitativa de estos nutrientes.

Medios de enriquecimiento: Son medios complejos, normalmente, con aditivos adicionales para favorecer el crecimiento de determinados microorganismos (particularmente heterótrofos exigentes). Tales como: adicción de sangre, suero o extractos de tejidos de animales y plantas.

Medios selectivos: Son aquellos que favorecen por su diseño el crecimiento específico de un microorganismo particular o grupo de microorganismos. Es de gran utilidad para el aislamiento de microorganismos a partir de una población microbiana mixta. Ejemplo: CO₂ como fuente de carbono es selectivo para autótrofos, adicionando cristal violeta se inhibe el crecimiento de los Gram (+), utilizando maltosa como única fuente de carbono sólo crecerán los que usen maltosa.

Medios diferenciales: Son aquellos destinados a facilitar la discriminación de microorganismos de una mezcla por sus propiedades diferenciales de crecimiento en dichos medios. Ejemplo: Agar sangre diferencia hemolíticos de no hemolíticos; McConkey diferencia lactosa (+) de lactosa (-).

Medios de mantenimiento: Suelen ser distintos a los de crecimiento óptimo ya que el crecimiento rápido y prolífico suele ocasionar la muerte rápida de las células. Por ejemplo: al añadir glucosa y utilizarla los microorganismos producen ácidos, acidificándose el medio por lo que es preferible no utilizar glucosa en los medios de mantenimiento.

Agar Sabouraud:

Medio para la detección y aislamiento de hongos en muestras mediante técnica de filtración por membrana. Para que ocurra el crecimiento selectivo de hongos sobre bacterias en la muestra depende tan solo de la reacción ácida (pH 5.6).

Composición por Litro:

Digestivo pancreático de caseína- 5g

Peptona de tejido digestivo -5 g

Dextrosa -40g

Agar- 1

SOLUCIONES

1. Solución reguladora de fosfatos pH 7.2
2. Solución salina

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



MEDIOS DE CULTIVO

Preparar los medios de cultivo a partir de mezclas deshidratadas comerciales respetando estrictamente las indicaciones del fabricante.

Cuando sea necesario preparar los medios de cultivo a partir de ingredientes señalados en su fórmula y de acuerdo a las siguientes instrucciones.

Disolver los sólidos solubles en el agua, calentar hasta disolución completa. Determinar el pH a 25 más o menos 2° C y ajustar si es necesario con soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 1 N según sea el caso.

Los medios de cultivo deben esterilizarse a 121° C durante 15 minutos a menos que en la formulación se indique otras condiciones.

Solución salina

Cloruro de sodio 8.5g

Agua destilada 1000 ml.

Disolver el cloruro en el agua, envasar en recipientes adecuados y esterilizar a 121° C durante 15 minutos.

Agar Soya Trypticaseína

Digerido pancreático de caseína 20.0g

Lecitina de soya 5.0g

Polisorbato 20 40 ml

Agua destilada 960 ml.

pH después de esterilizar 7.0±0.2 Disolver el digerido pancreático de caseína y la lecitina de soya en agua, calentar de 48° C a 50° C en BM por 30 minutos aproximadamente. Adicionar el Polisorbato 20, mezclar y esterilizar.

Agar Cetrimida.

Digerido pancreático de gelatina 20.1g

Cloruro de magnesio 1.4g

Sulfato de potasio 10.1

Agar 13.6g

Bromuro de etil trimetilamonio
(cetrimida) 03.3g

Glicerol 10.0ml g

Agua destilada 1000 ml

pH después de esterilizar 7.2 LO.2

Disolver en el agua los componentes sólidos, adicionar el glicerol. Calentar a ebullición con agitación constante durante un minuto.

Caldo lactosado

Autores: Br. Carrión Pérez Brenda Luz, Br. Cruz Pablo Emilio.



Extracto de carne 3.Ogr
Dirigido pancreático de gelatina 5.Og
Lacto 5.Og
Agua destilada 1000 ml.
pH después de esterilizar 6.9 ± 0.2
Después de esterilizar enfriar el medio de cultivo lo más rápido posible.

Caldo selentino — cistina.

Digerido pancreático de caseína 5.Og
Lactosa 4.Og
Fosfato de sodio 10.0 g
Selenito asido de sodio 4.0 grs.
l-cistina 0.Olg
Agua destilada 1000ml
pH final 7.0 ± 0.2
Calentar por medio de una comente de vapor durante 15 minutos.
esterilizar.

Agar Mac Conkey

Digerido pancreático de gelatina 17.0 g
Digerido pancreático de caseína 1 .5g
Digerido péptico de tejido animal 1.5 g
Lactosa 10.Og
Mezcla de sales Biliares 1 5g
Cloruro de sodio 5.0 g
Agar 12.5g
Rojo neutro 0.039
Cristal violeta 0.001g
Agua destilada 1000ml
pH después de esterilizar 7.1 ± 0.2

Agar Dextrosa Sabouraud

Dextrosa 40.0 g
Digerido péptico de tejido animal 5.0 g
Digerido pancreático de caseína 5.0 g
Agar 15.Og
Agua destilada



CUESTIONARIO

¿Que tipo de plantas tiene usted para combatir las enfermedades de origen Bacteriano?

¿De la lista mencionada anteriormente díganos las 3 que más vende?

¿Específicamente para que tipo de enfermedades las recomienda?

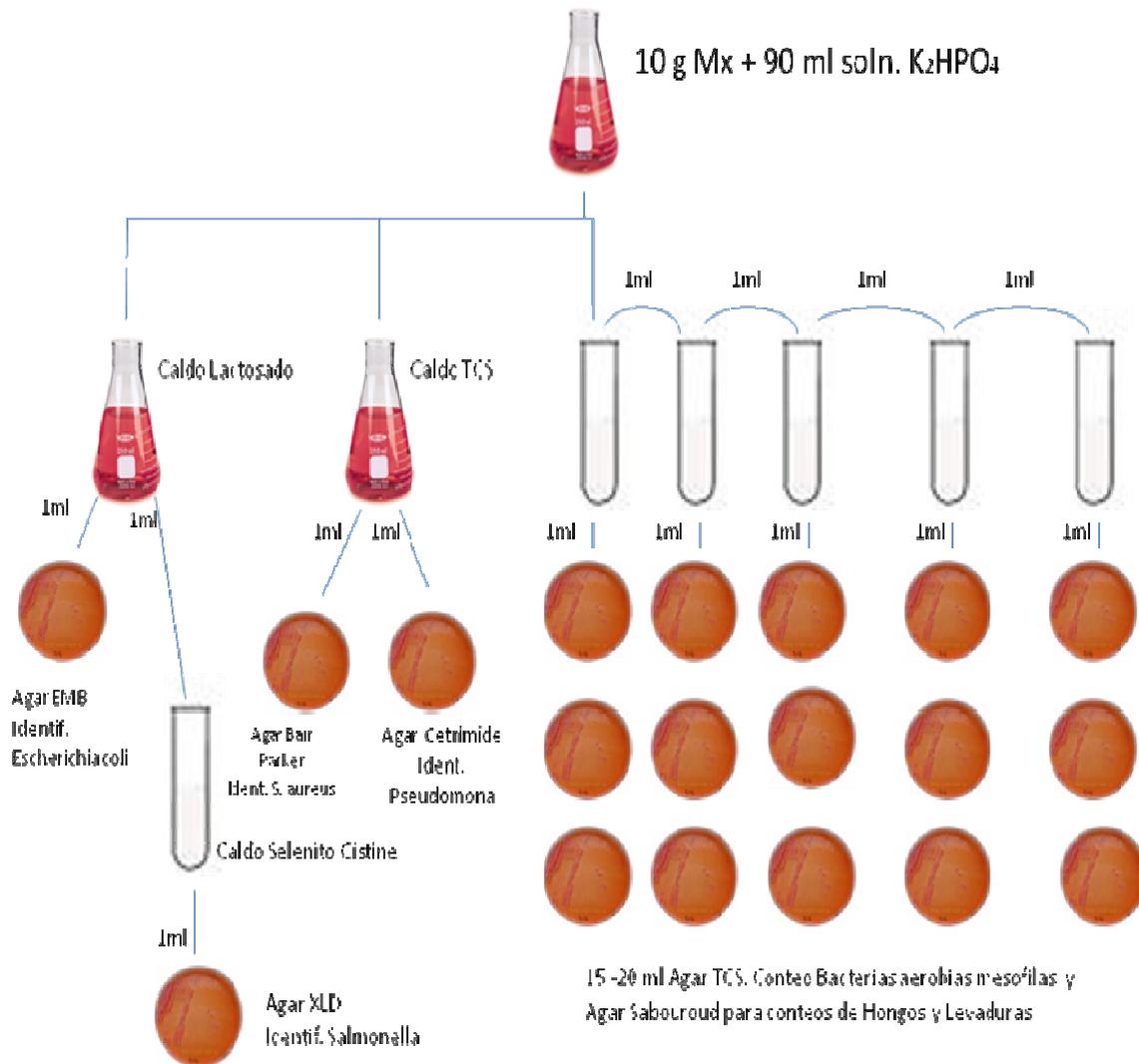
¿Tiene fecha de vencimiento, numero de lote y peso exacto en el paquete del producto?

¿Cada cuanto tiempo renueva este producto?

¿Nos puede decir de que zonas del País trae estos productos?

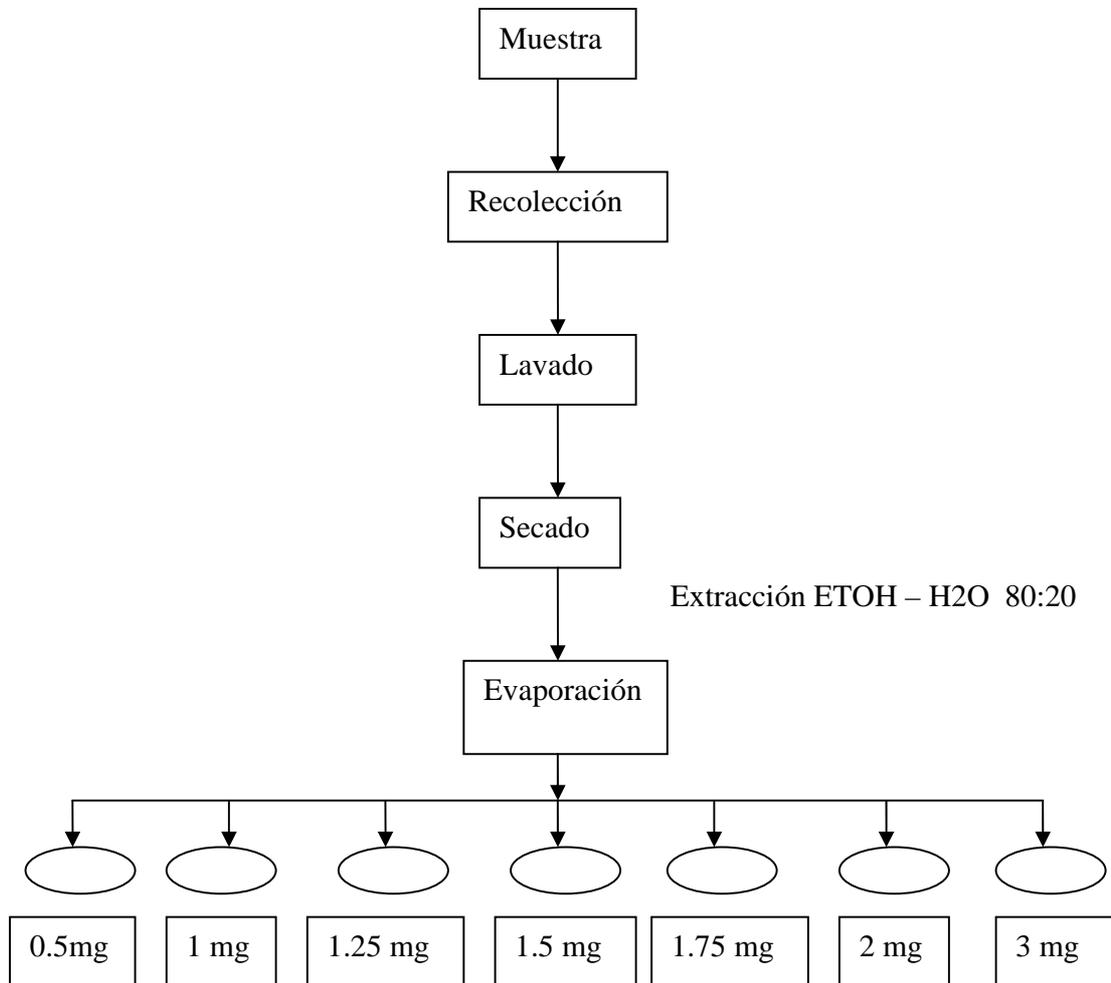


LIMITE MICROBIANO





BIOENSAYO





TINCION DE GRAM

