

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, LEÓN
UNAN-LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE FARMACIA**



Monografía para optar al título de licenciado Químico Farmacéutico

“Estudio microbiológico de post-comercialización de los productos: aceite de hígado de bacalao, enzimas pancreáticas, cartílago de tiburón, comercializados en farmacias privadas y botánicas del departamento de León en el mes de enero del año 2019”.

Presentado por:

Br. Clement Alicia Castellano Castellón.

Br. Cindy Junieth Castillo Castillo.

Br. Pandora Yukeli Flores Corrales.

Tutora:

MSc. Lisseth Aráuz.

León, Nicaragua, Julio, 2019

“A la libertad por la universidad”



DEDICATORIA

El amar a Dios es la mejor decisión que cualquier persona pueda llegar a tomar, determinarse a andar por sus caminos no tiene comparación; pero sus desbordantes recompensas de bendiciones, eso nos deja anonadados. Al creador de todas las cosas, el que nos ha dado fortaleza para continuar cuando a punto de caer hemos estado; por ello con toda la humildad que de nuestro corazón pueda emanar, dedicamos primeramente nuestro trabajo a Dios.

A nuestros Padres, por ser los pilares más importantes y demostrarnos siempre su cariño y apoyo ilimitado e incondicional que siempre nos han dado, por tener siempre la fortaleza de salir adelante sin importar los obstáculos y construir nuestro futuro.

A nuestra tutora MSc. Lisseth Aráuz por guiarnos durante el trabajo monográfico, por sus correcciones, su tolerancia y su comprensión.



AGRADECIMIENTO

A Dios nuestro Señor Jesucristo que es el único inspirador y dador de vida y sin Él no podía ser posible este trabajo, agradecemos a Él por bendecirnos la vida, por guiarnos a lo largo de nuestra existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad, sobre todo por permitir que nuestra amistad fuera duradera y llegáramos a estar unidas desde que comenzó nuestro camino en la universidad hasta el final de ésta.

Dicen que la mejor herencia que nos pueden dejar nuestros padres son los estudios, sin embargo no creemos que sea el único legado del cual nos sentimos muy agradecidas, nuestros padres nos han permitido trazar nuestro camino y caminar con nuestros propios pies. Ellos son nuestros pilares de la vida, por esto gracias a nuestros padres y hermanos por ser los principales promotores de nuestros sueños, por confiar y creer en nuestras expectativas, por los consejos, valores y principios que nos han inculcado.

Agradecemos a nuestros docentes por compartir sus conocimientos a lo largo de nuestra preparación, de manera especial, a nuestra tutora licenciada Lisseth Arauz quien ha guiado con su paciencia, y su rectitud como docente.

A nuestros amigos por su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de nuestras vidas. Con todos los que compartimos dentro y fuera de las aulas. Aquellos amigos del colegio, que se convierten en amigos de vida y aquellos que serán mis colegas, gracias por su apoyo y diversión.



INDICE

INTRODUCCIÓN	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
OBJETIVOS	4
Objetivo General	4
Objetivos específicos	4
MARCO TEÓRICO	5
DISEÑO METODOLÓGICO.....	39
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	47
CONCLUSIÓN.....	53
RECOMENDACIONES.....	55
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXOS	63



INTRODUCCIÓN

Hablando de producto natural (PN) se podría considerar como todo compuesto orgánico producido por cualquier organismo vivo, el término suele identificarse con el de un compuesto químico de bajo peso molecular (generalmente menor de 1500 uma) que es sintetizado por organismos biológicos. (Jimenez, 2013)

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. (Argüello Gallo, 2015)

Los productos naturales han sido la principal fuente de agentes medicinales en la sociedad durante siglos. Así mismo, el descubrimiento de nuevos agentes naturales con actividad terapéutica constituye una meta de la humanidad desde tiempos prehistóricos. En los últimos quince años surge la investigación de productos naturales para el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas de interés farmacéutico. (Ramírez V, Ruiz M. 204)

Son muchas las sustancias de origen animal que aparecen en el conjunto de recetas médicas. Estas sustancias forman parte de los ingredientes activos de los distintos preparados, de los recipientes que las contienen. Además, se hace mención tanto de animales enteros, especialmente cuando son pequeños como insectos, moluscos o algún tipo de pez; así como parte de ellos, especialmente cuando se trata de mamíferos y otros vertebrados de los que se aprovecha su carne, grasa, vísceras, sangre, huesos, dientes, etc. (Maria Pilar Lojendio Quintero)

Las bacterias juegan un papel fundamental en la naturaleza y en el ser humano: la presencia de una flora bacteriana normal es indispensable, aunque algunos gérmenes son patógenos.



Análogamente tienen un papel importante en la industria y permiten desarrollar importantes progresos en la investigación (Medrano K, Mayorga D, Mantilla E, 2013).

En gran parte los productos naturales permiten un máximo de carga microbiológica, pero se debe considerar la ausencia de microorganismos patógenos como son al menos la no presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* para productos de uso oral y de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, si son para uso tópico. La cantidad y tipo de microorganismos permitidos se especifica en normas de calidad provenientes de farmacopeas extranjeras.

Frente a esta necesidad y a la preocupación que genera ofrecer productos de calidad la investigación realizada permitió evaluar productos de origen animal como: Cartílago de Tiburón, Hígado de Bacalao y Enzimas Pancreáticas, que son importante por la gran oferta que tienen en el mercado.

En Nicaragua es escasa la información acerca de productos naturales de origen animal, así como el conocimiento y la capacitación en el manejo adecuado de estos productos. En la actualidad se ha generado la necesidad de tener más conocimiento sobre su actividad medicinal en el hombre, por tal razón la industria ha trabajado con la comercialización de materias primas en la elaboración de productos naturales; por esto en nuestro estudio evaluamos la calidad microbiológica en algunos productos de origen animal, para determinar si estos llegan a cumplir con todos los parámetros establecidos por el Reglamento técnico Centroamericano de productos naturales 11.02.56:09, garantizando que en su post-comercialización sean eficaces , eficientes y seguros para las personas que lo consumen.

Luego de una revisión bibliográfica no se encontró investigaciones y estudios realizados a productos farmacéuticos de origen animal, si sobre productos de origen vegetal y sintético.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El surgimiento de fármacos de origen animal ha tomado mucha importancia, ya que se ha reconocido el valor farmacológico de los animales como alternativa para ser aplicados en el campo de la salud pública. Por consiguiente, la seguridad y la eficacia de los productos de origen natural, debe sustentarse en la investigación científica, y la demostración de la actividad farmacológica y clínica, así como en la determinación de la posible toxicidad.

Cuando hablamos de medicamentos de origen animal, no debemos olvidar que existe un campo dedicado a la sanidad animal y que también puede afectar a salud de las personas: son los medicamentos de uso animal. Ante ellos, se debe seguir un adecuado control sanitario. (Ley de medicamentos y farmacia , Abril 1998)

Ante tal situación, nos hacemos el siguiente planteamiento:

¿Cómo es la calidad desde el punto de vista microbiológica de los productos de aceite de hígado de Bacalao, enzimas pancreáticas, cartílago de tiburón, comercializadas en farmacias privadas y botánicas del departamento de León en el mes de enero del 2019?



OBJETIVOS

Objetivo General:

- ❖ Determinar la calidad microbiológica de productos de origen animal; aceite de bacalao, enzimas pancreáticas y cartílago de tiburón comercializados en farmacias privadas y botánicas del departamento de León en el mes de enero del año 2019.

Objetivos específicos:

- ❖ Indagar la presencia de bacterias aerobias.
- ❖ Identificar la presencia de microorganismos patógenos: *Staphilococcus áureus*, *Pseudomona aeuruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*
- ❖ Cuantificar hongos y levaduras en las muestras analizadas.
- ❖ Verificar si los productos naturales cumplen con el etiquetado según el RTCA 11.04.41:06



MARCO TEÓRICO

La importancia de los productos naturales radica en la propia función biológica en la que son biosintetizados. Pueden ser útiles por sus posibilidades directas como agentes terapéuticos, pueden servir como modelos para la preparación de sustancias bioactivas, como materia prima para la síntesis de sustancias de interés farmacológico y/o interés industrial como estructuras privilegiadas usando el concepto de farmacología para aquellos productos que son capaces de interactuar con diversas proteínas y realizar acciones útiles para la salud en procesos patológicos. Sin lugar a dudas los productos naturales son estructuras biológicamente validadas a través de la co-evolución con el resto de los seres vivos. (Estudios pre-clínicos, 2007)

El éxito de los productos naturales radica en que son compuestos que ya han sido validados por la evolución, han sido biosintetizados, degradados, y transformados por sistemas enzimáticos. Por tanto, a la hora de interactuar con las moléculas dianas lo realizarán de una manera privilegiada. De esta forma los productos sintéticos sólo tendrán éxito cuando imiten a los Productos Naturales. En este siglo XXI el descubrimiento y desarrollo de fármacos debe basarse en: Una exploración extensiva de los Productos Naturales, utilizando todos los posibles recursos naturales. La mejora de los métodos de síntesis combinatorial asistidos por herramientas computacionales y un diseño racional mucho más avanzado. Una importante reducción de los costos de fármacos de origen biológico. Los recursos naturales podrán ser terrestres, plantas superiores, microorganismos, vertebrados e invertebrados. Marinos tales como algas, esponjas, microorganismos con especial énfasis en actinomicetos e invertebrados.

En las últimas dos décadas, la industria farmacéutica internacional ha abierto una novedosa línea de productos, basada en extractos estandarizados de especies vegetales y animales. Esta tendencia responde a la búsqueda de medicamentos naturales por parte de los consumidores. Hoy en día, se puede palpar un compromiso creciente en cuanto a: la investigación, el desarrollo, la innovación, la producción y comercialización de medicamentos basados en los extractos estandarizados de estas especies. (ÁNGEL GUTIÉRREZ RAVELO, 2009)



ESTUDIOS DE POST COMERCIALIZACIÓN

Son estudios llevados a cabo luego de comercializado el medicamento y especialidad medicinal. Estos estudios son ejecutados sobre la base de las características con que fue autorizado el medicamento y/o especialidad medicinal. (Estudios pre-clínicos, 2007).

Generalmente son Estudios de Vigilancia Postcomercialización, para establecer el valor terapéutico, la aparición de nuevas reacciones adversas y la confirmación de la frecuencia de aparición de las ya conocidas, las estrategias de tratamiento y la contaminación microbiana que pueden estar presentes en los productos. Luego que un medicamento y/o especialidad medicinal ha sido comercializado, los estudios clínicos diseñados para explorar nuevas indicaciones, nuevos métodos de administración o nuevas combinaciones (asociaciones), etc., son considerados como estudios de nuevo medicamento y/o especialidad medicinal. (Ley de medicamentos y farmacia , Abril 1998)

LÍMITE MICROBIANO

Los ensayos de control sobre la contaminación microbiana deben entenderse tanto de forma cuantitativa como cualitativa. Según esto, en los medicamentos como cosméticos no deben haber agentes de enfermedades (especies patógenas) y el contenido de saprofitos no debe de sobre pasar los valores límites definidos, para evitar variaciones de un medicamento y/o un cosmético en cuanto a su aspecto, sabor, olor, estabilidad, consistencia, descomposición, intolerancia, disminución de actividad y otros.

El límite microbiano, es un conjunto de pruebas cuyo objetivo es evaluar la calidad sanitaria de los productos farmacéuticos (materias primas, productos intermedios y terminados), mediante el recuento de organismos mesófilas, hongos filamentosos y levaduras; así como la investigación de microorganismos objetables en dichos estudios. (Ojeda, 2009)

Pruebas Preliminares:

La validez de las pruebas descansa fundamentalmente en la demostración de que las muestra bajo ensayo, no inhibe el crecimiento de microorganismo que puedan estar presentes. Por tanto, previo a la realización de límite microbiano y de acuerdo ha como lo requieren las



circunstancias, es necesario inocular porciones diluidas de la muestra con diferentes cultivos, tales como:

- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Candida albicans*
- *Aspergillus niger*
- *Salmonella spp*

Factores que afectan el límite microbiano:

a) Temperaturas de las incubadoras:

La temperatura a la cual son sometidos los platos con los medios específicos para el crecimiento de los microorganismos es de mucha importancia ya que un aumento o disminución de esta puede impedir el crecimiento por no presentar condiciones óptimas para su desarrollo.

b) pH para los medios de cultivo:

De igual forma una variación ya sea aumento o disminución del pH óptimo de un microorganismo interfiere de forma significativa en el desarrollo de éstos, por tanto, se debe comprobar el pH del medio al cual se va a someter una muestra.

c) Deficiente lavado y esterilización de la cristalería:

El lavado y la posterior esterilización de la cristalería en la cual se va a trabajar debe hacerse de forma eficiente, bajo condiciones asépticas de modo que no queden residuos de cloro y detergente ya que estos pueden interferir en el crecimiento de los microorganismos o provocar resultados erróneos. El tiempo transcurrido desde la primera dilución hasta su incorporación en los medios de cultivos no deben de exceder a una hora.

**Muestreo:**

Proporcionar muestras de 10 ml. o 10 g para cada una de las pruebas requeridas en la monografía correspondiente.

Procedimiento:

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

En el caso de sólidos que se disuelven en gran medida pero no totalmente, reducir las sustancias a un polvo moderadamente fino, suspenderlo en el vehículo especificado y proceder según se indica en recuento total de microorganismos Aerobios y en prueba para determinar la ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* y prueba para determinar la ausencia de *Salmonella spp* y *Escherichia coli*.

En el caso de muestras líquidas que consisten en una solución verdadera o una suspensión en agua o un vehículo hidroalcohólico que contenga menos de 30 % de alcohol, y para aquellos sólidos de disolución fácil y casi total en 90 ml. de solución amortiguadora de fosfato a pH 7.2 o en los medios especificados, proceder según se indica en recuento total de microorganismos aerobios y en prueba para determinar la ausencia de *staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* y prueba para determinar la ausencia de *Salmonella spp* y *Escherichia coli*.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA Y MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivos pueden prepararse como se indica a continuación, o bien pueden utilizarse medios de cultivo deshidratados, siempre y cuando una vez reconstituidos según las indicaciones del fabricante o del distribuidor, contengan ingredientes similares y constituyen medios comparables a los obtenidos con las fórmulas proporcionadas aquí. Para preparar medios según las fórmulas que se describen aquí, disolver los sólidos solubles en el agua, utilizando calor si fuera necesario, para lograr una disolución completa y agregar



soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio en cantidades suficientes para obtener el pH deseado en el medio cuando esté listo para ser utilizado.

Determinar el pH a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Cuando la fórmula requiera agar, utilizar agar que no contenga más de 15 % de humedad. Cuando la fórmula requiera agua, utilizar agua purificada.

Solución amortiguadora de fosfato de pH 7.2:

Solución madre/disolver 34 g de fosfato monobásico de potasio en aproximadamente 500 mL de agua en un matraz volumétrico de 1000 mL. Ajustar a un pH de 7.2 ± 0.1 agregando hidróxido de sodio SR (aproximadamente 175 mL), agregar agua a volumen y mezclar. Verter en recipientes y esterilizar, Almacenar bajo refrigeración. Para su uso diluir la Solución Madre con agua en una proporción de 1 a 800 y esterilizar.

Medios de cultivo:

A menos que se indique algo diferente en la etiqueta del medio de cultivo, éstos deben esterilizarse en autoclave por 15 a 25 minutos a 120°C . Los medios a utilizar son:

- Medio Líquido de Digerido de Caseína-Lecitina de Soja-Polisorbato 20.
- Medio Agar con Digerido de Caseína-Soja.
- Medio Líquido de Digerido de Caseína-Soja.
- Medio Manitol-Agar Salado.
- Medio Agar de Baird-Parker.
- Medio Agar de Vogel-Johnson.
- Medio Agar Cetrimida.
- Medio Agar Pseudomonas para la Detección de Fluoresceína.
- Medio Agar Pseudomonas para la Detección de Piocianina.
- Medio Líquido de Lactosa.
- Medio Líquido de Selenio-Cistina. (OPS/OMS, RECOPIADO ABRIL 2019)



BACTERIAS

Son seres generalmente unicelulares que pertenecen al grupo de los protistas inferiores. Son células de tamaño variable cuyo límite inferior está en las $0,2\mu$ y el superior en las 50μ ; sus dimensiones medias oscilan entre 0.5 y 1μ .

Las bacterias tienen una estructura menos compleja que las células de los organismos superiores; son células procariotas (su núcleo está formado por un único cromosoma y carecen de membrana nuclear). Igualmente son muy diferentes a los virus, que no pueden desarrollarse más dentro de las células y que solo contienen un ácido nucleico (Pérez Z, Paredes A, Palacios V, 2004).

Las bacterias juegan un papel fundamental en la naturaleza y en el ser humano: la presencia de una flora bacteriana normal es indispensable, aunque algunos gérmenes son patógenos. Análogamente tienen un papel importante en la industria y permiten desarrollar importantes progresos en la investigación (Medrano K, 2013)

Morfología de las Bacterias:

Las diferencias que se manifiestan entre las bacterias dependen de su forma; hay tres tipos morfológicamente distintas:

- Formas esféricas o de cocos.
- Formas alargadas o de bacilos.
- Formas espirales, espirilos y espiroquetas. (López, Recopilado Abril 2019)

Las bacterias se clasifican en Gram positivos y Gram negativos. En las bacterias Gram positivas se encuentran las que provocan supuraciones, infecciones en la piel y mucosa, como es el caso del *Staphylococcus*. Las bacterias Gram negativas pueden producir enfermedades tales como; tifoidea, salmonellosis, infecciones intestinales, como es el caso de la bacteria *Escherichia coli*, *salmonella* o *Klebsiella* (Ramírez V, Ruiz M. 2004).



Escherichia coli

Característica

Son bacilos Gram negativos dotados de motilidad por flagelos peritricos o carentes de motilidad; crecen en condiciones aerobias y anaerobias (son anaerobios facultativos); tolera la bilis; fermentan la glucosa en vez de oxidarla y con frecuencia producen gas; capaz de crecer a 44°C.

Identificación de laboratorio

Forman colonias lisas, circulares, convexas, con bordes bien diferenciados. Crece con facilidad en los medios de laboratorios habituales y en medios selectivos que contienen bilis. Fermenta la lactosa. Disponemos de un juego de reactivos para su identificación completa.

Enfermedades

Infección de la vía urinaria; enfermedades diarreicas; meningitis del recién nacido; septicemia (Ramírez V, Ruiz M. 2004).

Staphylococcus aureus

Características

Es una bacteria esférica (coco), que puede encontrarse agrupada en pares, en cadenas cortas o en grupos en forma de racimos de uva. Estos organismos son Gram-positivos y algunas cepas producen una toxina proteica estable al calor que causa enfermedades en los humanos (food info net. 2011).

Enfermedades

Los *Staphylococcus aureus* pueden causar infección cuando penetran la piel a través de una cortadura o una úlcera o cuando dichas bacterias ingresan al cuerpo a través de un catéter o un tubo de respiración. La infección puede ser menor y local (por ejemplo, un grano) o puede ser más seria (Moreillon P. 2011).



La mayoría de las infecciones por *Staphylococcus aureus* se presentan en personas con sistemas inmunitarios débiles, generalmente pacientes que se encuentran en hospitales y centros médicos de cuidados a largo plazo. Las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina son conocidas como infección por MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) un tipo de bacteria potencialmente peligrosa que es resistente a ciertos antibióticos y puede causar infecciones de la piel y de otro tipo (Moreillon P. 2011).

Salmonella spp

Característica

Bacilos gran negativo, móviles, que no forman esporas. Carecen de cápsulas capaces de respiración aeróbica y anaeróbica.

Identificación de laboratorio

Tolera la bilis, no es delicado, oxidativo negativo, no fermenta la lactosa, crecen rápidamente sobre medios simples, forman ácido y a veces gas a partir de glucosa y manosa, sobreviven sobre aguas congeladas durante periodos prolongados. Son resistentes a sustancias químicas (verde brillante, tetracionato de sodio).

Enfermedades

Son patógenas para humanos o animales cuando se adquiere por vía oral. Por lo general producen una enfermedad diarreica de forma muy ocasional invasivos y producto de esto causa enteritis, infección sistémica y fiebre entérica (Ramírez V, Ruiz M. 2004).

Factores ambientales que afectan el crecimiento de microorganismos en los medios de cultivos:

- Cantidad de nutrientes requeridos para el cultivo.
- Temperatura y Aeración.
- Calidad de Agar.
- Fuente de Energía (carbono y nitrógeno específico para el microorganismo).
- pH.



FACTORES EXTRÍNSECOS DETERMINANTES DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS PRODUCTOS FARMACOLÓGICOS.

- Clima
- Humedad.
- Estado físico.
- Tratamiento tecnológico.
- Empaque / Almacenaje.
- Contaminación bacteriana exógena.

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 vitrum = 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.

Mesófilos.

Muchas especies del suelo, del agua y del cuerpo crecen bien a temperaturas que oscilan entre 10°C y 45°C. No obstante, sus temperaturas óptimas de crecimiento son cerca de 30°C y 45°C, y varían según las especies. Las que se desarrollan bien se denominan mesófilas (del griego meso = mitad o medio, Philie = elegir).

Aerobio.

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

Anaerobio.

Microorganismo capaz de crecer o metabolizar en ausencia de oxígeno libre, puede ser obligado (es decir morirán en presencia de oxígeno) o facultativo (crece en ausencia o presencia de oxígeno).



Los microorganismos para su estudio se agrupan en el reino protista y al clasificarlos se mantiene la clasificación hecha por D.Bergeys, que los ubica en familias, tribus, género. (Hylary, Recopilado mayo 2019)

Para este estudio resulta de interés las familias:

- Enterobacteriaceae.
- Microcaceae.
- Pseudomonadaceae.
- Hongos verdaderos.

Familia Enterobacteriaceae.

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

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°C a 37°C. Las especies móviles están flageladas de modo peritrico, algunos microorganismos de la familia producen peptinasa; 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 esporogénea, son gran negativos, aerobios, algunas especies son patógenas primarias peligrosas, que ocasionan fiebre tifoidea, disentería, diarrea infantil e infecciones del conducto urinario y otros órganos, además existen otras especies parásitas de plantas que provocan marchites y podredumbres ligeras. Los géneros que integran estas familias son: *Salmonella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Proteus*, *Shiguella*, *Escherichia*, *Aerobacter*, *Klebsiella*, *Peptobacterium*. (Francis Maria Cerda Altamirano. Mabelkis Oneyda Chavarría Rojas, 2008) (Mateos-Rodríguez, Recopilado Mayo 2019)



Género Escherichia:

Es un género muy esparcido en la naturaleza, entre su especie la más importante es la *Escherichia coli*, que es la especie más 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 puede ser inicio de contaminación fecal.

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

Género Salmonella:

El género *Salmonella* consiste en células de forma bacilar habitualmente móviles 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 algunas enfermedades tales como; tifus, alteraciones gastrointestinales (salmonelosis), septicemia (invade la sangre), fiebre tifoidea y paratifoidea, etc.

Salmonelosis: Enfermedad provocada por *Salmonella* que va desde un dolor intestinal leve hasta enfermedad fatal.

Dentro de las características diferenciales de la *Salmonella* utilizaremos como ejemplo la *Salmonella thypi*, siendo esta: xilosa variable; tehalosa y sulfuro de hidrógeno positivo; arabinosa, agar citrato y gas en dextrosa, indol negativo.

Familia Microcaceae:

Las Microcaceae, son Gram. Positivos, no formadores de esporas y principalmente saprofitas que viven libremente, suelen ser esféricas o esferoidales y se dividen en dos o tres plantas, algunas veces formando acumulo o masa de cocos semejantes a racimos de uva o bien grupos aplanados, cuadrados de cuatro elemento.



La familia incluye los, géneros *Micrococcus*, *Sarcinas*, *Estaphylococcus*, *Methanococcus* y *Peptococcus*. (Roja, Recopilada Abril 2019)

Género *Estaphylococcus*.

Este género microscópicamente suele confundirse con *micrococcus*, su representante forma masas irregulares, aunque casi siempre se agrupa 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 fácilmente en la piel, membranas, mucosa de nariz y boca, heridas infectadas, etc. Donde aparecen en grandes cantidades aun 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 fermenta 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.

Familia Pseudomonadaceae.

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

Genero *Pseudomonas*: Es una bacteria polimorfita Gram negativas, móvil, es aerobio obligado, se desarrolla a temperaturas optimas de 37°C. Pero incluso puede crecer a los 40-41°C. Sucumbe a 60°C. A una 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 en heridas infectadas y en la uretra.

En el hombre provoca procesos supurativos locales o generalizados: otitis, pielitis, cistitis, queratitis, meningoencefalitis y septicemia. Los niños pequeños y debilitados son los más susceptibles a la infección por *Pseudomonas*. En los enfermos afectados por esta bacteria el pus y las vendas se colorean de azul verdoso. (Montero, Recopilado Mayo, 2019)

Prueba para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*

Agregar medio líquido de digerido de caseína-soja a la muestra para obtener 100ml, mezclar e incubar. examinar el medio para verificar el crecimiento y si hubiera crecimiento, utilizar un asa de inoculación para realizar estrías con una porción del medio sobre la superficie del medio Agar de VogelJohnson o medio Agar de Bair-parker o medio manitol Agar salado) y del medio Agar Cetrimide, cada de uno de ellos colocados en placa petri. Cubrir las placas, invertirlas e incubar. Si al examinarlas ningunas de las placas contiene colonias con las características enumeradas en la tabla 1 y 2 para los medios utilizados, la muestra de pruebas cumple con los requisitos de ausencia de staphylococcus aureus y pseudomona aeruginosa. (Francis Maria Cerda Altamirano. Mabelkis Oneyda Chavarría Rojas, 2008)

Tabla 1: Características morfológicas de *Staphylococcus aureus* en medio agar selectivo.

Medio selectivo	Morfología Característica de las colonias
Medio Agar de Vogel Johnson	Negro, rodeado de una zona amarilla.
Medio Manitol Agar Salado	Colonias Amarillas con zonas amarillas.
Medio Agar de Baird-Parker	Negro, brillante, rodeados de zonas transparentes de 2 mm a 5 mm

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

Agregar a la muestra que está contenida en un vaso adecuado, un volumen de medio líquido de lactosa para obtener 100 ml e incubar. Examinar el medio para verificar el crecimiento y,



si hubiera crecimiento, mezclar agitando suavemente. Pipetear porciones de 1ml y transferir a vasos que contengan, respectivamente, 10ml de Medio Líquido de Selenito-Cistina y de Medio Líquido de Tetrionato, mezclar e incubar durante 12 a 24 horas conservar el remanente del medio líquido de lactosa.

Prueba para determinar la ausencia de *Salmonella spp.*

Por medio de un asa de inoculación, realizar estrías de los Medios de Selenito-Cistina y de Tetrionato sobre la superficie del medio Agar con Sulfito de Bismuto contenido en placas de petri. Cubrir las placas, invertir e incubar. Al examinar las placas, si ninguna de las colonias se ajusta a la descripción que aparece en la tabla 2. La muestra cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia del genero *Salmonella*.

Tabla 2: Características morfológicas de *Salmonella spp* en medio agar selectivo.

Medio selectivo	Morfología Característica de las colonias
Medio Agar Verde Brillante	Pequeñas, transparentes, incoloras o de color rosado a blanco opaco (frecuentemente rodeadas por una zona de color rosado a rojo).
Medio Agar con Xilosa-Lisina-Desoxicolato.	De color rojo, con o sin centros negros.
Medio Agar con Sulfito de Bismuto	De color negro o verde.

Si se encuentran colonias de bastones gram- negativos que se ajustan a la descripción de la tabla 2, proceder con una identificación adicional transfiriendo colonias sospechosas representativas individualmente, por medio de un asa de inoculación, a un tubo inclinado de medio Agar-Triple Azucar Hierro estriando primero la superficie inclinada y luego clavando el asa bien por debajo de la superficie. Incubar. Si en el examen no se hallan indicios de que los tubos presentan líneas oblicuas alcalinas (rojas) y extremos ácidos (amarillos), (con o sin un ennegrecimiento concomitante de los extremos por producción de sulfuros de



hidrógenos), la muestra cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia del género *Salmonella*.

Prueba para determinar la ausencia de *Escherichia coli*: con ayuda de un asa de inoculación, hacer estrías con una porción del medio líquido de lactosa restante sobre la superficie del medio agar de MacConkey. Cubrir las placas, invertirlas e incubarlas. Al examinar las placas, si ninguna de las colonias se ajusta a la descripción que aparece en la tabla 3 para este medio, la muestra cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *Escherichia coli*.

Tabla 3: Características morfológicas de la *Escherichia coli* en medio Agar de MacConkey y EMB.

Medio selectivo	Morfología Características de las colonias
MacConkey	De color rojo ladrillo, pueden tener una zona de bilis precipitadas alrededor.
EMB	De color negro con brillo verde metálico.

Si se encuentran colonias, proceder con una identificación adicional transfiriendo las colonias sospechosas individualmente, por medio de un asa de inoculación, a la superficie de medio Agar de Levine con Eosina-Azul de Metileno colocadas en placas de petri. Si se debe transferir un número grande de colonias, dividir la superficie de cada placa en cuadrantes y sembrar cada uno de ellos con una colonia diferente. Cubrir las placas, invertirlas e incubarlas. Al examinarlas, si ninguna de las colonias exhibe un brillo metálico característico bajo la luz reflejada y si ninguna de ellas presenta una apariencia negro azulado bajo la luz transmitida, la muestra cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia de *Escherichia coli*. La presencia de *Escherichia coli* se puede confirmar mediante otras pruebas adicionales bioquímicas y de cultivos adecuados, si fuera necesario.

PARÁMETROS ESTABLECIDOS EN EL RTCA 11.03.56:09 PARA PRODUCTOS NATURALES DE USO HUMANO:



Según la RTCA 11.03.56:09, exige que se cumplan los siguientes parámetros para Productos Naturales de uso humano.

➤ Etiquetado

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

➤ Pruebas.

Pruebas físicas, químicas y microbiológicas.

Forma farmacéutica.	Pruebas.
<p>Tabletas con y sin recubrimiento.</p>	✓ Características organolépticas.
	✓ Variación de peso.
	✓ Friabilidad.
	✓ Fuerza de Ruptura.
	✓ Desintegración.
	✓ Determinación de Agua.
	✓ Identificación general o específica.
<p>Cápsulas de gelatina dura y blanda.</p>	✓ Características organolépticas.
	✓ Desintegración (cápsulas duras).
	✓ Variación de peso.
	✓ Determinación de agua.
	✓ Identificación general o específica.
	✓ Recuento microbiano.
<p>Soluciones, suspensiones y Emulsiones.</p>	✓ Características organolépticas.
	✓ Volumen de entrega. *
	✓ pH.
	✓ Densidad.
	✓ Identificación general o específica.
✓ Contenido alcohólico.	



	✓ Recuento microbiano.
--	------------------------

NOTAS:

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

Especificaciones para determinación de recuento microbiano. Expresados en UFC/g o cm³.

Producto natural	Recuento total de aerobios viables	Recuento total de hongos y levaduras	Recuento total de Enterobacterias
Preparaciones de administración oral.	$\leq 10^4$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$

Especificaciones para determinación de microorganismos patógenos. Expresados en UFC/g o cm³.

Producto Natural.	<i>Staphylococcus aureus.</i>	<i>Escherichia coli.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	<i>Salmonella Sp.</i>
Preparaciones de administración oral.	Ausente	Ausente	-----	Ausente

NOTA:

1. Se toma como referencia las especificaciones para determinación de microorganismos patógenos del presente reglamento los valores aportados por el



Apéndice XVI D: “Microbiological quality of pharmaceutical preparations” de la Farmacopea Británica 2007, Volumen 4, por contener la información más completa en torno a los recuentos microbiológicos permitidos.

2. Se realizarán sólo los parámetros microbiológicos definidos en este Reglamento, los cuales se expresarán en función de la metodología utilizada con las unidades correspondientes a < 3 NMP/g o < 10 UFC/g que equivale a “Ausente”.

ETIQUETADO DE PRODUCTOS NATURALES SEGÚN RTCA 11.04.41:06

Etiquetado del envase / empaque primario

La información que deberá llevar la etiqueta del envase o empaque primario del producto, cuando no tenga empaque o envase secundario, es la siguiente:

- a) Nombre del producto.
- b) Forma farmacéutica.
- c) Indicaciones.
- d) Modo de empleo.
- e) Composición cualicuantitativa de las sustancias activas naturales (incluyendo nombre científico), por forma dosificada
- f) Número de inscripción o registro.
- g) Nombre del laboratorio fabricante y país de origen. En caso de fabricación por terceros, se debe incluir nombre y país de origen de los laboratorios involucrados en los diferentes procesos de fabricación.
- h) Cantidad o volumen neto del producto terminado en el envase declarado en el Sistema Internacional de Unidades.
- i) Número de lote.
- j) Condiciones de almacenamiento.
- k) Fecha de vencimiento.
- l) Contraindicaciones y advertencias si proceden.
- m) Leyendas generales.
- n) Leyendas especiales, si proceden.
- o) Dosis.



p) Vía de administración.

En caso de que el producto se dispense al usuario con su empaque o envase secundario o con inserto, la información indispensable que debe incluir en el envase o empaque primario debe ser:

- a) Nombre del producto.
- b) Número de lote.
- c) Fecha de vencimiento.
- d) Nombre o logotipo del laboratorio fabricante.

Etiquetado del envase / empaque secundario

La información que deberá llevar la etiqueta del envase o empaque secundario del producto es la siguiente:

- a) Nombre del producto.
- b) Forma farmacéutica
- c) Indicaciones.
- d) Modo de empleo.
- e) Composición cualicuantitativa de ingredientes activos (incluyendo nombre científico) por forma dosificada.
- f) Número de inscripción o registro.
- g) Nombre del laboratorio fabricante y país de origen. En caso de fabricación por terceros, se debe incluir nombre y país de origen de los laboratorios involucrados en los diferentes procesos de fabricación.
- h) Cantidad o volumen neto del producto terminado en el envase declarado en el Sistema Internacional de Unidades.
- i) Número de lote.
- j) Condiciones de almacenamiento.
- k) Fecha de vencimiento.
- l) Contraindicaciones y advertencias (si proceden).
- m) Interacciones (si proceden).
- n) Efectos adversos (si proceden). o) Leyendas generales.



- o) Leyendas especiales, si proceden.
- p) Posología.
- q) Vía de administración
- r) Uso durante el embarazo, en el período de lactancia, en ancianos y niños menores de dos años.

Leyendas generales y especiales

Las leyendas que deben figurar en el etiquetado del producto natural medicinal, se citan a continuación.

- Leyendas generales: Manténgase fuera del alcance de los niños. Para modalidad de venta libre: Si los síntomas persisten consulte a su médico.
- Leyendas especiales: cuando el producto lo requiera.

MÉTODOS DE RECUENTOS MICROBIANOS.

Los métodos descritos en el presente ítem son los detallados la Farmacopea Americana para el recuento de microorganismos (USP 36).

1. Ensayo de fertilidad, idoneidad del método de recuento y controles negativos. (USP 36)

Debe establecerse la capacidad del ensayo para detectar microorganismos en presencia del producto a examinar y confirmarse la idoneidad de un método cada vez que se introduzca alguna modificación en la realización del ensayo, o en el producto, que pueda influir en los resultados.

2. Preparación de los microorganismos de ensayo. (USP 36).

Se recomienda utilizar suspensiones de cepas de ensayo de colecciones reconocidas prepararlas como se indica a continuación.



Es conveniente aplicar técnicas de mantenimiento de cultivo de lote de siembra (sistemas de lote de siembra) de modo que los microorganismos viables utilizados para la inoculación no hayan experimentado más de 5 pasajes a partir del lote de siembra primario original.

Cultivar por separado cada una de las cepas bacterianas y fúngicas de ensayo.

Para la preparación de las suspensiones de microorganismos es conveniente utilizar una solución de peptona-cloruro de sodio tamponada a pH 7,0 o un tampón fosfato a pH 7,2.

Para preparar la suspensión de *B. subtilis*, se prepara una suspensión estable de esporas y a continuación se usa para la inoculación un volumen apropiado de la misma. Esta suspensión de esporas puede mantenerse a 2-8 °C durante un periodo de tiempo validado.

3. Control negativo. (USP 36).

Para verificar las condiciones de trabajo resulta conveniente preparar un control negativo utilizando el diluyente elegido en lugar de la preparación a examinar. No se debe observar ningún crecimiento de microorganismos. Un resultado no conforme en el control negativo, requiere una investigación.

4. Idoneidad del método de recuento en presencia de producto. (USP 36).

Preparación de la muestra.

La preparación de la muestra depende de las características físicas del producto a examinar. Si no se puede demostrar que es satisfactorio ninguno de los procedimientos descritos a continuación, es necesario desarrollar un procedimiento alternativo.

Productos hidrosolubles: Disolver o diluir (generalmente se prepara una dilución 1 en 10) el producto a examinar en solución tamponada de peptona-cloruro de sodio a pH 7,0, tampón fosfato a pH 7.2 o caldo con hidrolizado de caseína y de soja. Si es necesario, ajustar a pH 6-8. Puede ser necesaria la preparación de diluciones adicionales con el mismo diluyente.

Examen del producto. (USP 36).

**Método de vertido en placa.**

Preparar la muestra utilizando un método que haya demostrado ser idóneo como se ha descrito previamente. Preparar al menos 2 placas de Petri para cada medio y para cada nivel de dilución. Incubar las placas de agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja a 30 - 35 °C durante 3-5 días y las placas de agar-agar glucosado de Sabouraud a 20 - 25 °C durante 5 - 7 días. Seleccionar las placas correspondientes a una dilución dada y que presentan el mayor número de colonias inferior a 250 para el RMAT y a 50 para el RLMT. Obtener la media aritmética de los recuentos por medio de cultivo y calcular el número de UFC por gramo o por mililitro de producto.

Interpretación de los resultados. (USP 36).

El recuento de microorganismos aerobios totales (RMAT) se considera igual al número de UFC encontrado utilizando agar-agar con hidrolizado de caseína y de soja; si en este medio se detectan colonias de hongos, se contabilizan como parte del RMAT. El recuento de levaduras / mohos combinados totales (RLMT) se considera igual al número de UFC encontrado utilizando agar-agar glucosado de Sabouraud; si en este medio se detectan colonias de bacterias, se contabilizan como parte del RLMT. Si se espera que el RLMT sobrepase el criterio de aceptación debido al crecimiento bacteriano, puede usarse agar-agar glucosado de Sabouraud que contenga antibióticos. Si el recuento se efectúa por el método del NMP, el valor calculado es el RMAT.

El criterio de aceptación en materia de calidad microbiológica, se interpreta como sigue:

- 10^1 UFC: número máximo aceptable = 20;
- 10^2 UFC: número máximo aceptable = 200;
- 10^3 UFC: número máximo aceptable = 2000, y así sucesivamente.

Recuento total combinado de hongos y levaduras.

Proceder como se indica en el método en placa el recuento total de microorganismos aerobios, excepto que se debe utilizar la misma cantidad de Medio Agar de Sabouraud o



Medio Agar Papa Dextrosa, en lugar de Medio Digerido de Caseina-Soya y se deben incubar las placas de petri invertida durante 5 a 7 días a una temperatura de 20°C a 25 °C.

Repetición de la prueba.

A fin de confirmar un resultado dudoso mediante cualquiera de los procedimientos descritos en las pruebas anteriores después de su aplicación a una muestra de 10 g, puede realizarse una nueva prueba en una muestra de 25 g del producto. Proceder como se indica en procedimientos teniendo en cuenta que la muestra es más grande. (Francis Maria Cerda Altamirano. Mabelkis Oneyda Chavarría Rojas, 2008)

Ensayo de Microorganismos Específicos. (USP 36).

Los métodos descriptos en el presente ítem son los descriptos por la Farmacopea de los Estados Unidos Americana.

La preparación de las muestras se efectúa como se describe en el ítem de recuento de microorganismos. Si el producto a examinar posee actividad antimicrobiana debe ser, en la medida de lo posible, eliminada o neutralizada como se ha descripto en el ítem de recuento de microorganismos. Si se utilizan sustancias tensioactivas para la preparación de las muestras, debe demostrarse la ausencia de toxicidad para los microorganismos y su compatibilidad con los inactivadores utilizados.

Debe establecerse la capacidad del ensayo para detectar microorganismos en presencia del producto a examinar. Debe confirmarse la idoneidad del método cada vez que se introduzca alguna modificación en la realización del ensayo, o en el producto, que pueda influir en los resultados.

Preparación de las cepas de ensayo. (USP 36).

Utilizar suspensiones estables provenientes de colecciones reconocidas de las cepas de ensayo. Se deben aplicar técnicas de mantenimiento del cultivo del lote de siembra (sistemas de lote de siembra) de modo que los microorganismos viables usados para la siembra hayan experimentado como máximo 5 pases a partir del lote de siembra primario original.



ACEITE DE HIGADO DE BACALAO

Es un complemento nutricional que se utiliza para tratar afecciones de la salud ocasionadas por deficiencias alimenticias y de vitaminas.

Este producto tiene una consistencia líquida, pero espesa. Una sustancia que aporta importantes nutrientes al cuerpo humano. Aunque su sabor y olor original son un tanto amargos, las presentaciones más recientes tienen otros aromas que, comúnmente, son los de cereza y naranja.

Si bien el aceite de hígado de bacalao tiene mucha publicidad reciente, este producto tiene una antigüedad que se remonta a finales del siglo XIX. De hecho, este complejo vitamínico está enmarcado en la línea de los aceites comerciales de hígado de bacalao.

Suele elaborarse con *Gadus morhua*, además de otras especies. Estas grasas han tenido múltiples fabricantes a lo largo y ancho de la historia y tienen sus orígenes en Europa, lugar del mundo cuyos mares son propicios para la cría de este pez.

Esta sustancia oleosa ha experimentado un proceso continuo de renovación en su fórmula y composición.

Dada la necesidad de preservar el medio ambiente, se han buscado formas de hacer que el hígado de bacalao se pueda sintetizar por medios artificiales en el laboratorio, cuidando que se conserven sus propiedades nutricionales y por ende, sus cualidades terapéuticas por la que es tan conocido entre los consumidores.

Suele estar orientada a los niños, razón por la cual se ha calificado a este producto como uno de carácter pediátrico. La mayor demanda en este grupo de población se debe a que una alimentación completa es la base para su adecuado crecimiento y el desarrollo de su organismo. Sin embargo, este complemento también puede ser consumido por los adultos,



que también pueden ser víctimas de diversas deficiencias vitamínicas. (Estudios pre-clínicos, 2007).

Este óleo no es más que uno de los muchos tipos de aceites de pescado que contienen altos niveles de ácidos grasos. Por ejemplo, el famoso Omega 3, presente en cualquier farmacia y que se puede consumir en cápsulas blandas. El aceite de hígado de bacalao también contiene ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico.

Es importante recalcar que el aceite de hígado de bacalao es popular por la Emulsión de Scott, pero que ese producto no fue el primero ni el único en aparecer en el mundo.

La apariencia del aceite de hígado de bacalao en la Emulsión de Scott tiene diferencias con la descripción anterior. Comparte su sabor y su textura en el paladar, pero no lo hace su color, que es más bien blanquecino. No obstante, esta mezcla sí preserva sus propiedades químicas, en las que se combinan las vitaminas A y D con los ácidos grasos que están en este aceite de pescado, el Omega 3 por excelencia.

Indicaciones

A menudo se utiliza para los grupos que pueden requerir más cantidades de las vitaminas A y D proveniente de los ácidos grasos del Omega 3. Estas personas son los ancianos, las mujeres mayores con menopausia, las personas con problemas de desnutrición, las féminas embarazadas o en período de lactancia (con las precauciones pertinentes del médico), los niños que están en etapa de crecimiento y los bebés a los que apenas les está saliendo la dentadura (dentición).

También se recomienda en pacientes que tienen trastornos clínicos causados por las deficiencias de fósforo, calcio y vitaminas A y D. Entre estos padecimientos están la osteoporosis o la hipovitaminosis. También la hipocalcemia, provocada por los bajos niveles de calcio en sangre y el raquitismo, una afección de los huesos. (Estudios pre-clínicos, 2007)



Administración y dosis

La administración Del hígado de bacalao es oral. Aunque las dosis deben ser consultadas con el especialista, normalmente éstas son diarias.

La posología común suele basarse en una toma de 3 veces al día para adultos y niños de 6 años en adelante. Los niños de 2 a 6 años, deben tomar la emulsión 2 veces al día y los de un año solo 1 vez al día. (Estudios pre-clínicos, 2007)

Las cantidades consumidas por los pacientes no deben exceder las indicaciones prescritas por el médico.

Farmacocinetica y Farmacodinamia.

El aceite de hígado de bacalao es fuente natural rica en vitaminas A, D y ácidos grasos omega-3, esenciales para el sano crecimiento y desarrollo de huesos y dientes, ya que contiene los nutrientes DHA y EPA que contribuyen al desarrollo neuromotor y sensorial en la infancia y a que mejorar el estado físico y funciones cerebrales en niños y adultos. Estos nutrientes están emulsificados para una óptima absorción y son fácilmente asimilables.

Precauciones y contraindicaciones.

Se desaconseja que la Emulsión de Scott se tome sin la previa asesoría de un profesional, especialmente durante el embarazo o la lactancia. Un consumo excesivo puede provocar una sobredosis y la aparición de efectos adversos que podrían desencadenar en una hipervitaminosis.

Además, la Emulsión de Scott debe consumirse tras haber agitado bien el envase, afin que la mezcla de sus ingredientes se mantenga homogénea.

Efectos adversos potenciales

Ninguno, salvo por sobredosis y por alergia a los componentes de la Emulsión de Scott. En el primer caso puede experimentarse dolor de cabeza, irritabilidad, anorexia y náuseas.



Interacciones

Medicamentos anticoagulantes y otros suplementos vitamínicos en los que el metabolismo de la vitamina D se incrementa por encima de los niveles normales.

Por esta razón, no debe consumirse cuando ya hay en curso un tratamiento contra la desnutrición o la deficiencia de vitaminas. (Lifeder, 2018)

ENZIMAS DIGESTIVAS

Son proteínas especializadas, producidas de forma natural dentro de su cuerpo. Cada una, está diseñada para desintegrar un tipo específico de molécula en su comida. Por ejemplo:

- **Extracto de bilis de buey (el 45% de ácido cólico)** – Contiene enzimas lipasas para desintegrar la grasa alimentaria. Además, incluye otras sustancias naturales para ayudar a emulsionar las grasas en pequeñas micro-gotas fáciles de procesar y fácilmente absorbibles.

- **Pancreatina** (Contiene **Proteasa, Amilasa y Lipasa**)
 1. **La Proteasa:** ayuda a descomponer las proteínas.
 2. **La Amilasa:** ayuda a descomponer los carbohidratos de cadena larga, como almidón y glucógeno (la molécula de almacenamiento de energía en el tejido animal).
 3. **La Lipasa:** Ayuda a descomponer las grasas.

- **Bromelina:** Derivada de la piña. La bromelina es una de las maneras más fuertes, más seguras y más probadas para ayudar a descomponer las proteínas.

- **Papaína:** Al trabajar en conjunto con la bromelina y proteasa, la papaína proporciona un potente knockout para ayudarle a lidiar con el consumo de proteínas.

- **Celulasa:** Ayuda a descomponer la fibra para proporcionarle una óptima nutrición de alimentos vegetales



- **Invertasa:** Ayuda a descomponer todos los tipos de azúcares.
- **Alfa Galactosidasa:** Ayuda a desintegrar los carbohidratos resistentes a la amilasa.

La mayoría de las enzimas naturales son producidas en su páncreas y realizan su carga de trabajo en sus intestinos. Las enzimas ofrecen el mayor beneficio en el intestino delgado.

Sin embargo, si es como muchas personas, cuyas reservas de enzimas llegan a agotarse por una u otra razón, es posible que no sea capaz de digerir óptimamente sus alimentos. El envejecimiento es una de esas situaciones que puede afectar la producción natural de enzimas.

Suplementar la producción natural de enzimas podría ayudarle a:

- Disminuir las molestias menores de la inflamación ocasional
- Reducir la sensación de pesadez después de haber comido mucho
- Eliminar la preocupación sobre el estreñimiento ocasional o de gas

Cuando toma un suplemento de enzimas que contiene enzimas procedentes de animales, tales como el extracto de pancreatina y bilis de buey, el desafío es lograr que sobrevivan el paso por el estómago sin dañarse ni degradarse.

Mecanismo de acción.

Las enzimas pancreáticas de la pancreatina catalizan la hidrólisis de las grasas de los ácidos grasos monoglicéridos, glicerol y libres, proteínas en péptidos y aminoácidos, y los almidones en dextrinas y azúcares de cadena corta, tales como maltosa y maltotriosa en el duodeno y el intestino delgado proximal, actuando de este modo como las enzimas digestivas fisiológicamente secretada por el páncreas.

Farmacocinética.

Las enzimas pancreáticas de la pancreatina están recubiertas por una cubierta entérica para reducir al máximo la destrucción o inactivación de las mismas por los ácidos gástricos. La



pancrelipasa está diseñada para liberar la mayoría de las enzimas a un pH aproximado de 5.5 o mayor. Las enzimas pancreáticas no son absorbidas desde el tracto gastrointestinal en cantidades apreciables y ejercen sus efectos localmente en el intestino.

Indicaciones y Posología

Tratamiento de la insuficiencia pancreática exocrina debido a la fibrosis cística, pancreatitis crónica, pancreatectomía, u otras condiciones:

La pancreatina se administra por vía oral. El tratamiento debe iniciarse con la dosis más baja recomendada y se incrementa gradualmente. La dosis de pancreatina debe individualizarse basándose en los síntomas clínicos, el grado de esteatorrea presente, y el contenido de grasa de la dieta.

Administración oral

Bebés < 1 año: la pancreatina se debe administrar a los bebés inmediatamente antes de cada comida, usando una dosis de 3.000 unidades de lipasa por 120 ml de biberón o antes de la lactancia materna. El contenido de la cápsula se administrarse directamente a la boca o con una pequeña cantidad de puré de manzana, y seguidamente se administra el biberón o la leche materna o fórmula. El contenido de la cápsula no se debe mezclar directamente en el biberón, ya que la eficacia puede disminuir. Se debe tener cuidado para asegurar que la pancreatina no se aplasta, se mastica o se retiene en la boca, para evitar la irritación de la mucosa oral.

Niños > 12 meses y < 4 años comenzar con 1000 unidades de lipasa/ kg de peso corporal por comida para niños menores de 4 años de edad hasta un máximo de 2.500 unidades de lipasa/kg de peso corporal por comida (o menos o igual a 10.000 unidades de lipasa/kg de cuerpo unidades de peso por día), equivalente a 4000 unidades de lipasa/ g grasa ingerida por día.

Niños de > 4 años y < 12 años: el tratamiento debe comenzar con 500 unidades de lipasa/kg de peso corporal por comida para los mayores de 4 años de edad hasta un máximo de 2.500 unidades de lipasa/kg de peso corporal por comida (o menos que o igual a 10.000 unidades



de lipasa/kg de cuerpo unidades de peso por día), o menos de 4000 lipasa / g grasa ingerida por día.

Niños y Adultos: La dosis inicial y el aumento de la dosis por comida debe individualizarse basándose en los síntomas clínicos, el grado de esteatorrea presente, y el contenido de grasa de la dieta. En un ensayo clínico, los pacientes recibieron pancreatina en dosis de 72.000 unidades de lipasa por comida con un consumo de al menos 100 g de grasa por día. Las dosis iniciales más bajas recomendadas en la literatura son consistentes con 500 unidades de lipasa / kg de peso corporal por dosis comida. Por lo general, la mitad de las dosis de pancreatina prescritas para una comida completa individualizada debe administrarse con cada bocado.

La pancreatina se debe tomar durante las comidas o meriendas, con suficiente líquido. Las cápsulas deben tragarse enteras. Para los pacientes que no pueden tragar las cápsulas intactas, las cápsulas pueden ser cuidadosamente abiertas y el contenido añadido a temperatura ambiente a una pequeña cantidad de alimento blando ácido con un pH de 4,5 o menos, como puré de manzana. Esta mezcla se debe tragar inmediatamente sin triturarla o masticarla, y después tomar agua o jugo para asegurar la ingestión completa. Se debe tener cuidado para asegurarse que nada del fármaco se retiene en la boca.

Efectos secundarios

Reacciones alérgicas como erupción cutánea, picazón o urticarias, hinchazón de la cara, labios o lengua

- Fiebre o escalofríos. Dolor de garganta
- Dolor o hinchazón estomacal severo
- Falta de aliento
- Erupción cutánea
- Dificultad al defecar
- Vómito

Efectos secundarios que, por lo general, no requieren atención médica (debe informarlos a su médico o a su profesional de la salud si persisten o si son molestos):



- Estreñimiento o diarrea
- Tos
- Mareos
- Dolor de garganta
- Náuseas
- Gas estomacal
- Dolor estomacal
- Pérdida de peso

Embarazo, lactancia y fertilidad

Si está embarazada o en periodo de lactancia, cree que podría estar embarazada o tiene intención de quedarse embarazada, consulte a su médico o farmacéutico antes de utilizar este medicamento.

No existen datos en mujeres embarazadas o en periodo de lactancia, pero los estudios en animales no muestran absorción ni exposición sistémica de los enzimas pancreáticos. Deben tomarse precauciones a la hora de prescribir esta medicación a embarazadas, así como a mujeres en periodo de lactancia.

En caso de que sea necesario emplear Kreon durante el embarazo o la lactancia debe administrarse en dosis que sean suficientes para obtener un estado nutricional adecuado.

Contraindicaciones

Hipersensibilidad a los componentes de la fórmula. Las enzimas pancreáticas no deben administrarse en las fases iniciales de la pancreatitis aguda, agudización de afecciones pancreáticas, crónicas ni en pacientes con antecedentes de hipersensibilidad a pancreatina de origen porcino.



CARTÍLAGO DE TIBURÓN

El cartílago de tiburón evidentemente posee particulares características estructurales que le diferencian del cartílago de los vertebrados superiores y el hombre. Han sido sometidas a estudio y comprobadas las acciones analgésica e inhibidora de la angiogénesis. Otras acciones biológicas investigadas fueron: acción antiinflamatoria, antimutagénica, activadora de la respuesta inmunológica y antilipemiente. (Dr.Mario Estevez Baez. Dr.Roberto Ortega, 1999)

El polvo desecado del cartílago de tiburón (CT) constituye un producto natural, al cual, además de suplemento nutricional, se le atribuyen un conjunto de propiedades benéficas en la profilaxis y el tratamiento de distintas enfermedades y especialmente en la terapia del cáncer (Menéndez López J, Fernández-Britto J. Cartílago de tiburón como opción terapéutica en el cáncer avanzado refractario a los procedimientos oncoespecíficos convencionales.

El cartílago de tiburón (tejido elástico resistente que proporciona apoyo, de manera similar a como lo hacen los huesos) que se utiliza en las medicinas proviene principalmente de los tiburones capturados en el Océano Pacífico. Los diferentes tipos de extractos de cartílago de tiburón incluyen el lactato de escualamina, el AE-941 y el U-995. (Dr.Mario Estevez Baez. Dr.Roberto Ortega, 1999)

¿Para qué sirve el cartílago de tiburón?

El cartílago de tiburón ha sido estudiado durante algunos años, por lo que ha logrado patentarse en muchos países.

Usos del cartílago de tiburón

El cartílago de tiburón tiene grandes beneficios. En cuanto a salud se le dan los siguientes usos:

- Para tratar problemas óseos, articulares y circulatorios.
- Permite la disminución de problemas como hemorroides.
- Disminuye la aparición de células cancerígenas.
- Ayuda a tratar problemas como el glaucoma.



- Protege el sistema digestivo.
- Refuerza el sistema inmunológico.
- Fortalece el crecimiento muscular.
- Para reducir afecciones pulmonares como el asma.

¿Cómo tomar el cartílago de tiburón?

A este respecto se refiere que puede ser tomado como suplemento alimenticio. Aunque es aconsejable que sea algunas horas antes o después de comer.

Para potenciar sus efectos se recomienda la ingesta consecutiva del tratamiento. En vista de los antecedentes que sustentan que pacientes con más de 40 meses de tratamiento, han observado efectos descomunales. Las investigaciones realizadas en los últimos años han patentado los numerosos beneficios que aportan al organismo. Destacando las mejoras obtenidas en el sistema óseo y articular. Sin embargo, existen algunas contraindicaciones, por lo que es aconsejable consultar con el médico antes de comenzar a ingerirlo. (Dr.Mario Estevez Baez. Dr.Roberto Ortega, 1999)

Contraindicaciones

Una de las contraindicaciones, es la sobrecalcificación por consumo junto con otros suplementos de calcio. Por esta razón, es razonable realizarse pruebas de rutina que muestren los niveles de minerales en el organismo. Puesto que estos deben ser evaluados por un profesional que apruebe el consumo del cartílago de tiburón.

La finalidad es evitar cualquier posible malformación o daño al feto o bebé recién nacido. (Dr.Mario Estevez Baez. Dr.Roberto Ortega, 1999)

Efectos Secundarios

Se han apuntado registros cartílago de tiburón efectos secundarios en algunas personas, como los siguientes:

- Náuseas.
- Vómitos.



- Estreñimiento.
- Malestar estomacal.
- Mareos.
- Presión arterial baja.
- Niveles altos de azúcar en la sangre.
- Fatiga.
- Elevados niveles de calcio.
- Alergias a los componentes del cartílago de tiburón

También se ha patentado en ciertos estudios que dicho cartílago alberga toxinas como el BMAA, que propicia enfermedades degenerativas importantes como el Alzheimer. Aunque con certeza no se ha podido determinar esto, si es adecuado tener cuidado con ello. (Dr.Mario Estevez Baez. Dr.Roberto Ortega, 1999).



DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de Estudio:

Es un estudio experimental, de corte transversal.

Área de estudio:

Laboratorio de Microbiología, carrera de Farmacia, facultad de Ciencias Químicas, UNAN LEÓN.

Población:

Productos de Aceite Hígado de Bacalao, Enzimas Pancreáticas, Cartílago de Tiburón que se comercializan en farmacias y botánicas de León.

Muestra:

La muestra consiste en tres productos naturales de origen animal (3 frascos de aceite hígado de bacalao, 3 blister de enzimas Pancreáticas, y 3 frascos de cartílago de tiburón).

Tipo de muestreo:

No probabilístico y de aceptación, debido a que permite establecer criterios para seleccionar la muestra, así como lo que nos planteamos y exponemos posteriormente en el estudio.

Procedimiento de recolección de la muestra:

Los productos utilizados en este estudio para su análisis fueron adquiridos a través de la compra en farmacias locales (Aceite de hígado de Bacalao, Enzimas Pancreáticas) y botánicas especializadas en productos de origen natural (Cartílago de Tiburón) ubicadas en la ciudad de León. En total 3 productos distintos fueron objeto del análisis microbiológico.

Criterios de Inclusión de las muestra:

- Medicamentos de Origen Animal
- Muestras de Aceite de Hígado de Bacalao, Enzimas Pancreáticas, Cartílago de Tiburón, comercializados en las farmacias y botánicas de León.



Criterios de Exclusión de las muestras:

- Muestras de Origen Vegetal y Sintéticos.
- Muestras de origen animal, incluidas en el estudio; pero comercializadas ambulatoriamente y canastas de mercado.

Variable de estudio:

- Recuento de bacterias Aerobias.
- Recuento de Hongos y Levaduras.
- Identificación de Microorganismos Patógenos.
- Etiquetado.

Fuentes de información:

Fuente Primaria: Resultados obtenidos del análisis microbiológico de las muestras analizadas.

Fuentes Secundarias: Farmacopeas, libros, monografías, revistas, artículos científicos.



Operacionalización de las variables

Variable	Concepto	Indicador	Valor
Recuento de bacterias aerobias mesófilas	El recuento de microorganismos mesófilos aeróbicos, conocido también como recuento de placas aeróbicas, es el método más usual para la estimación del número de microorganismos viables en productos de consumo humano. (Hocking a. 2001).	Número de microorganismos viables desarrollados en los medios de cultivos.	$\leq 10^4$ UFC/g o mL
Recuento total combinado de hongos y levaduras	Método que se basa en inocular una cantidad conocida de muestra, en un medio de cultivo selectivo específico, aprovechando la capacidad de este grupo microbiano de utilizar como nutrientes a los polisacáridos que contiene el medio. (Hocking a. 2001).	Número de colonias de hongos y levaduras desarrollados en los medios de cultivos.	$\leq 10^2$ UFC/g o mL
Identificación de microorganismos patógenos.	Metodología precisa que permite la identificación de los microorganismos implicados en procesos de contaminación asociados a infecciones o de aquellos que tienen relación con el hombre. (Hocking a. 2001)	<i>Escherichia Coli</i> : Colonias de color rojo ladrillo. <i>Staphylococcus áureus</i> : Colonias de color amarillas o blancas. <i>Pseudomona aeruginosa</i> : Colonias de color verdoso <i>Salmonella spp</i> : Colonias de color rojo con centro negro	(+) Presencia (-) Ausencia.
Etiquetado	Información obligatoria incluida en la etiqueta, rótulo, imagen, u otra materia descriptiva o gráfica que se haya escrito, impreso, estarcido, marcado en relieve, que se adhiere o incluye en el envase de un producto natural medicinal. (RTCA 67.01.07:10)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Nombre completo. ✓ Nombre de laboratorio. ✓ Numero de lote. ✓ Fecha de vencimiento, ✓ Contenido, unidad de Dosis. ✓ Via de administración, ✓ Numero de registro sanitario ✓ Modalidad de venta. ✓ Nombre de laboratorio acondicionador. ✓ Condiciones de almacenamiento. ✓ Precauciones, contraindicaciones, advertencia. 	Cumple No Cumple



Materiales y equipos.

Nombre	Marca
Cocina corming hot plate.	Isotemp
Refrigerador.	_____
Incubadora europe.	Precisión scientific
Autoclave horizontal	Pelton crane.
Horno para esterilizar cristalería.	Model 25X-1
Contador de colonias laica	Quebec Darkfield.
Mechero busner.	Humboldt.
Balanza analítica.	Gibertini.
Baño María precisión.	GCA.
Pipetas de 10 ml.	KIMAX-S1.
Micro pipetas de 0.5mL.	_____
Placas Petri.	_____
Tubos de ensayo con rosca y sin rosca.	PYREX
Beaker de 250, 500, 650, 1000 ml.	KIMAX
Peras.	_____
Erlenmeyer de 250 ml.	PYREX
Espátulas.	-----
Asa de Henle.	-----
Gradillas metálicas	-----

Material descartable

- ✓ Guantes.
- ✓ Algodón.
- ✓ Papel de aluminio.
- ✓ Nasobucos.
- ✓ Gorros



Procedimientos generales:

Realizar la determinación en condiciones diseñadas para evitar la contaminación microbiana extrínseca del producto a examinar. Las precauciones a tomar para evitar la contaminación deben ser tales que no afecten a ningún microorganismo que deba detectarse en la prueba.

Si el producto a examinar posee actividad antimicrobiana, ésta debe eliminarse o neutralizarse en la medida de lo posible. Si se usan inactivadores para este fin, se debe demostrar su eficacia y la ausencia de toxicidad para los microorganismos. Si se emplean sustancias tensoactivas en la preparación de la muestra, se debe demostrar la ausencia de toxicidad para los microorganismos y su compatibilidad con cualquier inactivador usado.

Los medios de cultivos utilizados deben cumplir con dos requisitos: Esterilidad (control negativo) y promoción del crecimiento (control positivo).

Control negativo.

Para verificar las condiciones de prueba, realizar un control negativo usando el diluyente seleccionado en lugar de la preparación de prueba. No debe observarse crecimiento de microorganismos. Separar un tubo que contiene el medio de cultivo sin muestra, se incuba por el tiempo requerido y no debe observarse crecimiento microbiano.

Promoción del crecimiento de los medios.

Analizar cada partida de medio listo para usar y cada partida de medio preparado, a partir de medio deshidratado o de los ingredientes indicados.

Inocular porciones/placas de Caldo Digerido de Caseína y Soja y Agar Digerido de Caseína y Soja con un número pequeño (no más de 100 UFC) de los microorganismos indicados empleando una porción/placa individual de medio para cada uno. Inocular placas de Agar Sabouraud Dextrosa con un número pequeño (no más de 100 UFC) de los microorganismos indicados, empleando una placa individual de medio para cada uno. Incubar de acuerdo con las condiciones descritas.



Para medios sólidos, el crecimiento obtenido no debe diferir en un factor mayor de 2 a partir del valor calculado para un inóculo estandarizado. Para un inóculo recién preparado, se produce un crecimiento de microorganismos comparable al obtenido anteriormente con una partida de medio analizada y aprobada previamente. Los medios líquidos son adecuados si se produce un crecimiento claramente visible de microorganismos comparable al obtenido anteriormente con una partida de medio analizada y aprobada previamente.

Recuento de Organismos Mesófilos Aerobios.

Método vertido en placa.

Efectuar diluciones decimales necesarias para que 1 mL contenga entre 10 y 100 UFC/mL.

- Preparar un pool de cada una de las muestras en estudio, que consiste en tomar 3.5 g o mL de cada producto, hasta tener un total de 10 g o mL que se llevan a un Erlenmeyer que contenía 90 mL de solución amortiguadora de Fosfato pH ± 7.2 , para obtener 100 mL (10^{-1}). De esta solución, extraer 1 mL y transferir a un tubo de ensayo que contenga 9 mL de la solución amortiguadora de Fosfato ± 7.2 , obteniendo una segunda dilución (10^{-2}). Se realizan diluciones decimales sucesivas hasta 10^{-3} .
- De cada una de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} transferir 1 mL a dos placas petri estériles, y agregar inmediatamente a cada placa de 15-18 mL de Agar DCS por cada dilución, previamente fundido y enfriado a una temperatura de aproximadamente de 45°C.
- Cubrir las placas Petri con papel aluminio. Mezclar las muestras rotando suavemente las placas sobre una superficie plana y dejar solidificar el contenido a temperatura ambiente.
- Invertir las placas e incubar durante 24 - 48 hrs. a una temperatura de 30 a 35°C.
- Una vez finalizada la incubación, examinar las placas para verificar el crecimiento de microorganismos.
- Con un contador de colonias, contar el número de colonias y expresar el promedio de las dos placas en términos del número de microorganismos por g o mL (UFC/g o mL) de muestra y multiplicarlo por el factor de dilución.

**Criterio de aceptación.**

El producto se acepta si se observan UFC en cantidades menores a 10^4 UFC/g o mL de muestra.

Recuento de Hongos Filamentosos y Levaduras.

Proceder igual como se indica en el Recuento de Organismos Mesófilos Aerobios, con la excepción que se utiliza el medio Agar Dextrosa-Sabouroud. Incubar a 20 - 25°C durante 5 a 7 días.

Después del periodo de incubación contar el número de UFC existentes con ayuda del contador de colonias. Informar el número de UFC/g o mL de muestra tomando en cuenta el factor de dilución de la muestra.

Criterio de aceptación.

El producto se acepta si hay ausencia de colonias o la cantidad existente es menor de 10^2 colonias (UFC por g o mL) de muestra.

Determinación de microorganismos patógenos.***Escherichia coli.***

- De la muestra transferir 1mL o g a Caldo Digerido de Caseina Soja, incubar a 30 - 35°C durante 18 a 24 horas.
- Examinar el medio para ver si hay crecimiento (turbidez). Si lo hay transferir con un asa al agar Mac Conkey. Incubar a una temperatura de 42 a 44°C por 24 a 48 horas. Subcultivar en una placa de Agar MacConkey de 30 a 35°C por 24 a 72 horas.

Interpretación de los resultados.

Si se observan colonias de color rojo al examinar las placas, esto indica la probable presencia de *Escherichia coli*.

***Salmonella.***

- Transferir 0.1ml de caldo DCS a 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis para enriquecimiento de Salmonella e incubar de 30 a 35°C por 18 a 24h.
- Subcultivar en una placa de agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD). Incubar a una temperatura de 30 a 35°C por 18 a 48h.

Interpretación de los resultados.

El crecimiento de Colonias bien desarrolladas de color rojo que pueden presentar o no un centro negro indica la posible presencia de Salmonella. Si al examinar las placas petri las colonias formadas no presentan las características descritas anteriormente, se deduce que hay ausencia de Salmonella.

Pseudomona aeruginosa.

- Del medio DCS, subcultivar en una placa de Agar Cetrimide e incubar a una temperatura de 30 a 35°C por 18 a 72 horas.

Interpretación de los resultados.

El producto cumple con la prueba si no se desarrollan colonias o si los resultados de las pruebas de identificación confirmatorias con negativos. La prueba de identificación utilizada es la oxidasa, que si da positivo (color verdoso) se confirma la presencia de Pseudomona.

Staphylococcus aureus.

- Del medio DCS, subcultivar en una placa de Agar Manitol Salado e incubar a una temperatura de 30 a 35°C por 18 a 72 horas.

Interpretación de los resultados.

El crecimiento de colonias amarillas o blancas rodeadas de una zona amarilla indica la posible presencia de S.aureus.

El producto cumple con la prueba si no se desarrollan colonias de los tipos descritos o si la prueba confirmatoria da negativa.



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para la realización de los análisis limpiamos, cada una de las muestras de los productos con alcohol 70% y algodón, para después marcarlos de la siguiente manera:

Códigos asignados a cada una de las muestras en estudio.

Código	Muestras	Especificaciones
M-1	Enzimas pancreáticas	Tabletas de 500 mg
M-2	Cartílago de Tiburón	Cápsulas
M-3	Hígado de bacalao	Emulsión en frascos de 120 mL

**TABLA 1. Recuento de bacterias mesófilas aerobias de las muestras analizadas.**

Código Asignado	BAM		Especificaciones
M-1	10 ⁻¹	33×10 ¹ UFC/g	≤ 10 ⁴ UFC/g o mL
	10 ⁻²	<10 UFC/g	
	10 ⁻³	< 10 UFC/g	
M-2	10 ⁻¹	>300 UFC/g	
	10 ⁻²	>300 UFC/g	
	10 ⁻³	166×10 ³ UFC/g	
M-3	10 ⁻¹	26×10 ¹ UFC/mL	
	10 ⁻²	< 10 UFC/mL	
	10 ⁻³	< 10 UFC/mL	

En relación al crecimiento de BAM, después de las 24 horas de incubación se demostró crecimiento >10⁴ UFC/g en la muestra M-2 lo que se demuestra que no son aptas para su consumo ya que presentan una gran cantidad de bacterias aerobias de acuerdo a los criterios señalados en el RTCA 11.03.56:09. Por lo tanto, las muestras M-1, M-3, son aptas para su utilización de acuerdo con los criterios establecidos en el RTCA 11.03.56:09, ya que la cantidad encontrada esta dentro del parámetro establecido evidencia de crecimiento de BAM.

**TABLA 2. Recuento de hongos y levaduras de las muestras analizadas.**

Código asignado	Hongos y Levaduras		Especificaciones
M-1	10 ⁻¹	< 10 UFC/g	≤ 10 ² UFC/g o mL
	10 ⁻²	< 10 UFC/g	
	10 ⁻³	< 10 UFC/g	
M-2	10 ⁻¹	116 x 10 ¹ UFC/g	
	10 ⁻²	13 x 10 ² UFC/g	
	10 ⁻³	2 x 10 ³ UFC/g	
M-3	10 ⁻¹	< 10 UFC/mL	
	10 ⁻²	< 10 UFC/mL	
	10 ⁻³	< 10 UFC/mL	

En relación al recuento de Hongos y Levaduras a los 5 días de incubación la muestra M-1, M-3 presentaron un crecimiento menos 10² UFC/g o mL, por lo tanto son aceptables para el consumo de la población. La M-2 no cumple con los criterios al presentar un crecimiento mayor de 10 UFC/g que sobrepasa la especificación establecida en el RTCA 11.03.56:09, siendo no apta para su utilización de acuerdo con los criterios establecidos en el RTCA 11.03.56:09 al presentar crecimiento de hongos y levadura.



TABLA 3. Resultados de la identificación de microorganismos patógenos en muestras analizadas

Código asignado	<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomona A.</i>		<i>S.aureus.</i>		<i>Salmonella.</i>	
	Tiempo	24 Hrs.	48 Hrs.	24 Hrs.	48 Hrs.	24 Hrs.	48 Hrs.	24 Hrs.
M-1	-	-	-	-	+	+	-	-
M-2	+	+	+	+	+	+	-	-
M-3	-	-	-	-	-	-	-	-
Presencia de Crecimiento.			+					
Ausencia de Crecimiento.			-					

Para la identificación de las bacterias patógenas, se tomaron en cuenta, las características de crecimiento en cuanto a su forma, superficie, borde, color aspecto, elevación y posibles cambios en el medio de cultivo en cada una de las bacterias en estudio.

- ***Escherichia coli:*** de la muestra pre-enriquecida con agar MacConkey en los tres ensayos, en la M-1, M-3 se confirmó la ausencia de ésta en la muestra. La claridad y el no crecimiento en los medios de cultivo demostraron la ausencia del patógeno en la muestra, mientras que en la M-2 se observó de manera macroscópica en las placas del medio de agar MacConkey donde las colonias se pudieron observar de color rojo ladrillo, la muestra no cumple con los requisitos de la prueba, por lo tanto, se demuestra que hay presencia de *Escherichia*.
- ***Pseudomona aeruginosa:*** En el cultivo en agar cetrimide, se pudo constatar que la *Pseudomona aeruginosa* se encuentra ausente en las muestras M-1, M-3 estos productos cumplen con la prueba ya que no se desarrollaron colonias. En la M-2 si se pudo observar un crecimiento de colonias en el agar cetrimide observando colonias de color verdoso, con luz ultravioleta.



- ***Staphylococcus aureus***: en las muestras pre-enriquecida con medio manitol Agar Salado en los tres ensayos, en la M-3 se confirmó la ausencia de ésta en la muestra, en cambio en la muestra M-2 y M-1 se observó en las placas del medio de agar manitol salado colonias de color amarillo, demostrando que no cumple con los requisitos de la prueba, por lo tanto; se demuestra que hay presencia de *staphylococcus aureus*.
- ***Salmonella***: en el cultivo en agar XLD, se pudo confirmar que la *Salmonella* se encuentra ausente en las muestras M-1, M-2, M-3 puesto que no hubo crecimiento alguno en el agar. Pero en la muestras M-2 se logró observar la presencia de alguna bacteria muy distintas a lo que se analiza en la bibliografía consultada en lo que respecta a cada medio de cultivo.

**TABLA 4. Resultados de la revisión de etiqueta de las muestras.**

Información que debe llevar la etiqueta.		M-1	M-2	M-3
Nombre completo del o los principios activos en su denominación común y su concentración bajo la modalidad de unidosis. Se acepta omitir en el blíster, los principios activos de medicamentos polifármacos como en el caso de multivitamínicos, siempre y cuando se contemple en el empaque secundario.		✓	✓	✓
Nombre de la empresa responsable o laboratorio responsable o logotipo que identifique al laboratorio.		✓	✓	✓
Número de lote.		✓	✗	✓
Fecha de vencimiento		✓	✗	✓
Contenido, en volumen, unidades de dosis o masa.		✓	✗	✗
Vía de administración.		✓	✓	✗
Número de registro sanitario.		✓	✗	✓
Modalidad de venta.		✓	✗	✗
Nombre del laboratorio acondicionador o empacador (si es diferente al fabricante o al responsable) y país		✓	✗	✓
Condiciones de almacenamiento.		✓	✗	✗
Precauciones, contraindicaciones y advertencias, sino están incluidas en el inserto.		✓	✗	✗
Cumple	✓			
No cumple	✗			

De acuerdo al RTCA 11.04.41.06 productos farmacéuticos de productos naturales medicinales para uso humano. Los requisitos de etiquetado las muestra M-1, cumplen con los parámetros establecidos, en cambio la M-2 es carente de casi todos los requisitos, cumpliendo solo con un 27% de los parámetros a cumplir y la M-3 este posee el 55% de los requisitos establecidos.



CONCLUSIÓN

Todo producto de consumo humano debe contar con un análisis microbiológico para ser óptimo para su uso, para ello existen estrictos requisitos de calidad y así poder ser inocuos al llegar al mercado, de esta manera podemos garantizar la efectividad en la elaboración de dicho producto, las condiciones en la que se presenta la materia prima, la calidad de su equipo, la capacidad que posee el personal, la esterilidad del ambiente en que éste fue elaborado.

Los fármacos de origen naturales seleccionados para esta investigación, basados en resultados obtenidos después de la realización del límite microbiano (el cual es un ensayo para la determinación de microorganismos en productos farmacéuticos), presentaron una carga microbiana importante, por lo que podemos concluir que:

1. La muestra M-1 (enzima pancreática) cumple con todos los requisitos de etiquetado, pero este no cumple con todas las especificaciones establecidas en el reglamento técnico centro americano de productos naturales de uso humano (RTCA 11.03.56:09) en cuanto se refiere a la presencia de microorganismos patógenos ya que ésta evidencia la presencia de *Staphiloccocus áureus*, por lo tanto, no es óptima para el consumo de la población.
2. La muestra M-2 (cartílago de tiburón) encontramos gran cantidad de bacterias aerobias mesófilas al igual que de hongos y levaduras, también se observó presencia de *Escherichia coli*, *Staphiloccocus áureus* y *Pseudomona aeruginosas*. No se encontró la presencia de *Salmonella* pero pudimos identificar la presencia de una posible entero bacteria que no pudo ser analizada, por lo tanto este producto no cumple con el reglamento centro americano de productos naturales de uso humano (RTCA 11.03.56:09) y tampoco con los requisitos de etiquetados. Ésta muestra no es apta para el consumo humano puede causar daños muy perjudiciales para la salud del consumidor.



3. La muestra M-3 (hígado de bacalao) tiene una excelente calidad microbiológica está ausente de cualquier entero bacteria, hongos, levaduras y microorganismos patógenos, por lo tanto cumple con lo establecido en el reglamento técnico centro americano de productos naturales de uso humano (RTCA 11.03.56:09) y con todo los requisitos de etiquetado, siendo éste un producto apto para su consumo.

Este estudio es muy importante principalmente para demostrar la seguridad al consumidor del uso de estos productos.



RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos. las muestras M-1 y M-2 representan un riesgo para la salud del consumidor, ponemos a disposición de las autoridades facultativas el presente estudio por lo tanto recomendamos:

Al MINSA:

- Como ente regulador del control de calidad de medicamentos compruebe la inocuidad de los productos de origen natural.
- Que exija a todos los productos naturales de origen animal comercializados, el cumplimiento de Análisis Microbiológicos, debido a la alta demanda de estos por la población y compruebe la existencia de registro sanitario, fecha de vencimiento, número de lote, fecha de elaboración, contraindicaciones, indicaciones de todos aquellos productos de origen animal comercializados en botánicas.



BIBLIOGRAFÍA

1. Jimenez, C. (2013). El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual. Real Sociedad Española de Química.
2. Argüello Gallo, N. R. (2015). Análisis Microbiológico de Fitofármacos no obligatoriamente estériles por el laboratorio de ECOLIFE. León: UNAN.
3. Ángel Gutiérrez Ravelo, a. E. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp).
4. ESTUDIOS CLÍNICOS. (Junio 2007). DIVISIÓN PRODUCTOS DE SALUD. María Pilar Lojendio Quintero. (s.f.). Sustancias de origen animal en recetas de escribionio. Universidad de la Laguna.
5. Paredes A, Pérez Z, Palacios V. (2004) Determinación de la actividad antimicrobiana de los frutos del Bixa orellana L. en cepas de Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus y Klebsiella pneumoniae. Tesis para optar al Título de Licenciado Químico-farmacéutico. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León.
6. Ramírez V, Castellón M. (2004). Determinación de la Actividad Antimicrobiana en cepas de Pseudomona aeruginosa, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli, Salmonella typhymurium, Shigella flexneri, Klebsiella pneumoniae, a seis extractos de plantas que fueron colectadas en la Biodiversidad Vegetal de la Estación Biológica de Bartola – Río San Juan. Tesis para optar al Título de Licenciado Químico-farmacéutico. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León.



7. Br. Francis Maria Cerda Altamirano, B. M. (2008). Ensayo Microbiológico en Cápsulas de *Morinda citrifolia* L. (Noni) comercializadas ambulatoriamente en la Ciudad de León Nicaragua.
8. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Sexta edición Pág.1733 –1740
9. Reglamento Técnico Centro Americano. Productos farmacéuticos. Productos naturales para uso humano. Verificación de la calidad. RTCA 11.03.56:09
10. Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.04.41:06. Productos naturales de uso humano. Productos naturales con propiedades medicinales. Etiquetado de productos naturales.
11. (27 de octubre de 2018). Obtenido de Lifeder: <https://www.lifeder.com/emulsion-de-scott/>
12. Chicon, M. C. (5 de noviembre de 2018). Lifeder. Obtenido de Lifeder: <https://www.lifeder.com/emulsion-de-scott/>
13. Dr. Mario Estévez Báez. Dr. Roberto Ortega, D. d. (1999). Cartílago de tiburón: acciones biológicas, empleo y perspectivas. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.
14. Ley de medicamentos y farmacia, ley 292
15. (María José Suarez, 2000) Preparaciones farmacéuticas elaboradas con base en productos naturales, tesis de grado, Facultad de Ciencias Jurídicas y Socioeconómicas Santafé de Bogotá D.C. – Colombia.
16. (Recopilado abril, 2019) Formación continuada para farmacéuticos de hospital.



17. Medrano K, Mayorga D, Mantilla E. (2013). Evaluación de Actividad Antimicrobiana de 5 especies vegetales colectadas en la ciudad de León a través del Método MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio). Tesis para optar al Título de Licenciado Químico-farmacéutico. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León.
18. Asesor Externo Ma. De Jesús Pureco Ojeda, asesor interno Miriam Juárez Juárez (2009) Límite microbiano, tesis para optar al título ingeniero farmacéutico, Instituto Politécnico Nacional México D,F
19. (Recopilado Abril 2019) Peligros biológicos. OPS/OMS obtenido de: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es
20. (Recopilado abril 2019) Generalidades de las bacterias obtenido: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>
21. (Recopilado mayo 2019) crecimiento bacteriano en tubo, obtenido de: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/metabolismo-bacteriano.html>
22. Puerta-García y F. Mateos-Rodríguez(2010) Enterobacterias (Recopilado Mayo 2019) Familia micrococcaceae, obtenido: www.coursehero.com/file/28700194/Familia-micrococcaceaepptx/
23. María Milagro Montero, 2012 Pseudomona aeruginosa multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos. Tesis doctoral
24. Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez. Hocking a. 2001. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.



25. Lic. Lisseth Arauz, Examen microbiológico de productos no estériles: prueba de recuento microbiano y prueba de microorganismos específicos, guía de laboratorio de control microbiológico-UNAN LEÓN.

26. Farmacopea de los Estados Unidos de América: USP 36, página 61-70.



ANEXOS



ANEXO 1

ABREVIATURA

AE-941	Sustancia que se elabora con cartílago de tiburón y que está en estudio por su capacidad de prevenir el crecimiento de vasos sanguíneos nuevos que los tumores necesitan para crecer. Es un tipo de antiangiogénico.
ATCC	Las cepas ATCC son microorganismos certificados para el control de calidad en microbiología
BMAA	Beta-N-metil aminoalanina
BPM	Buenas prácticas de manufactura.
Cm.	Centímetros.
CIP	Clasificación de los programas de instrucción, estos programas incluyen cursos de microbiología.
°C	Grados Centígrados
DHA	Ácido docosahexaenoico,
DCS	Digerido caseína soja
EPA	Ácido eicosapentaenoico.
G	Gramos
ISO/IEC	(International Organization for Standardization) e IEC (International Electrotechnical Commission).
Kg	Kilogramos
Mm	Milímetros
MINSA	Ministerio de Salud.
MRSA	Infecciones por estafilococo áureus resistente a la meticiclina.
NMP	Es un sistema de creación de juegos de tipo aventura conversacional para dos que actualmente se encuentra obsoleto.
NCIMB	National Collection of Industrial Food and Marine Bacteria
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OPS	Organización Panamericana de la Salud.
Ph	Coeficiente que indica el grado de acidez o basicidad de una solución acuosa
PN	Producto natural



RMAT	El recuento de microorganismos aerobios totales
RMLT	El recuento de levaduras / mohos combinados totales
RTCA	Reglamento Técnico Centroamericano
T°	Temperatura.
UNAN	Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
UFC	Unidad formadora de colonias.
UV	Radiacion ultravioleta visible.
USP	United States Pharmacopeia
μ	Micra



ANEXO 2. GLOSARIO

Agar: polisacárido obtenido de *geledium* y otras algas marinas; utilizados Como agente solidificante en los medios de cultivo.

Arabinosa: La arabinosa es un monosacárido de cincocarbonos con un grupo aldehído por l o que pertenece al grupo de las aldosas y dentro de este al de las aldopentosas.

Actinomicetos: son bacterias. Los actinomicetos son cosmopolitas, están distribuidos en los ecosistemas naturales en todo el mundo y juegan un papel importante en el reciclaje de la materia orgánica, dicho grupo microbiano ha recibido considerable atención de las industrias farmacéutica y alimentaria, en la biorremediación y últimamente en la agricultura, debido a que son fuente importante de sustancias con actividad biológica de gran utilidad para el hombre.

Bacteria: Un procariota unicelular, un miembro de los esquizomicetos hongos divididos.

Flagelos peritricos: Bacterias que poseen muchos flagelos rodeando su contorno.

Gadus morhua: El bacalao común, bacalao del Atlántico o bacalao de Noruega (*Gadus morhua*) es una de las cerca de 60 especies de una misma familia de peces migratorios. Vive en mares fríos del norte. Por lo general el bacalao del atlántico es de tamaño pequeño, aunque algunos ejemplares pueden llegar a alcanzar los cien kilogramos de peso con un tamaño de hasta casi dos metros. Se alimenta de otros peces más pequeños, como el arenque.

Gramnegativo: Microorganismo bacteriano que es rápidamente decolorado con alcohol en la coloración de Gram y que absorbe luego el calor de la tinción de fondo.

Microorganismo: Un organismo tan pequeño que no puede verse directamente a simple vista, incluye; bacterias, virus, protozoarios, hongos y algas unicelulares.



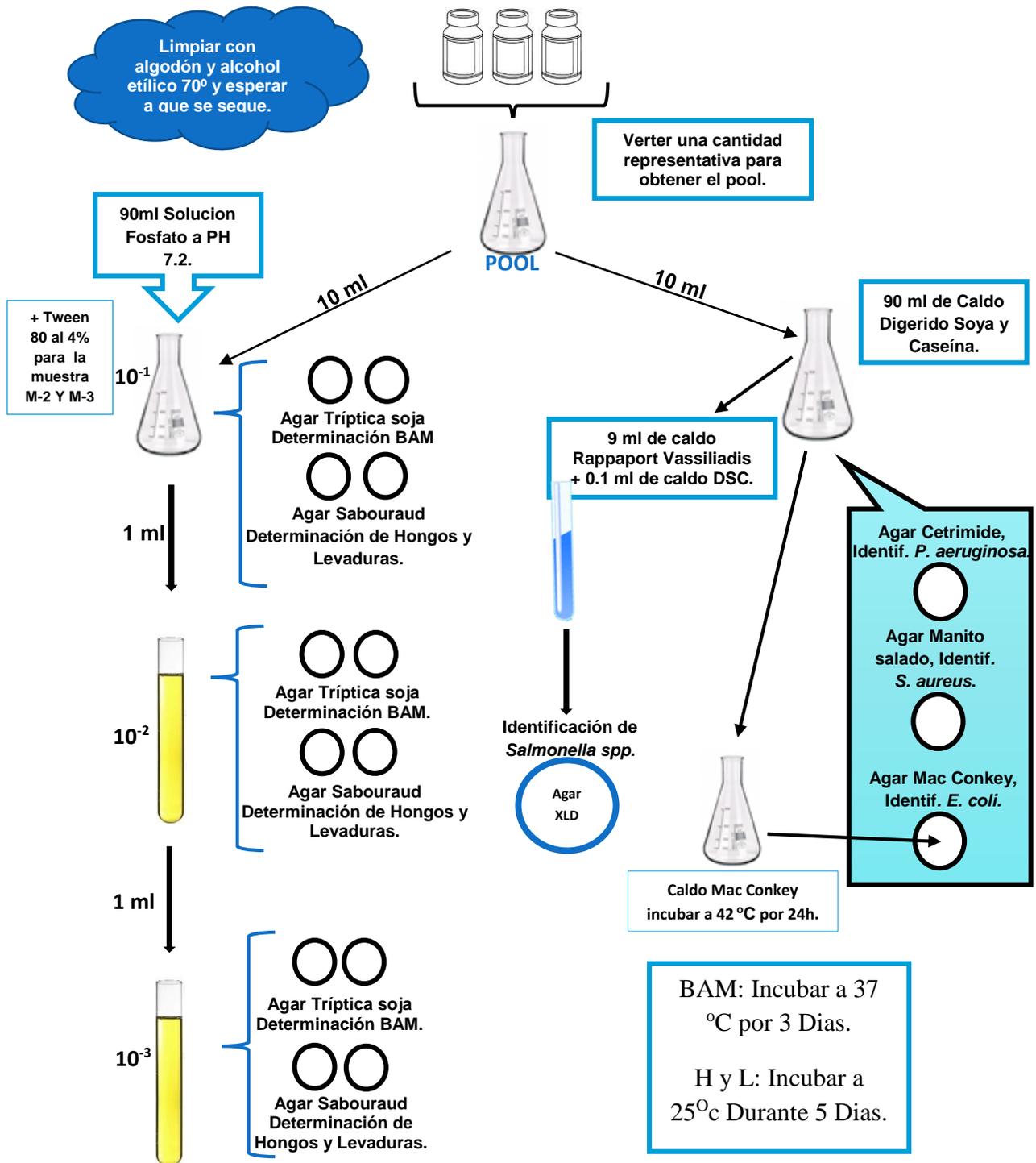
Patógeno: Elementos y medios que originan y desarrollan las enfermedades

Principio Activo: Sustancia química producida en el metabolismo de la planta que tiene actividad farmacológica.

Saprofitos: son hongos saprofitos, estos organismos que se encargan de descomponer la materia orgánica, su estructura celular está formada por hifas y el conjunto de éstas es el micelio, además algunas hifas maduran para producir los cuerpos fructíferos. En este trabajo nos apoyaremos de técnicas de cultivo, aislamiento y microcultivo para obtener los cuerpos fructíferos y con ayuda de una revisión bibliográfica identificar los hongos a nivel de género, así como el reconocimiento de su importancia en los ecosistemas.

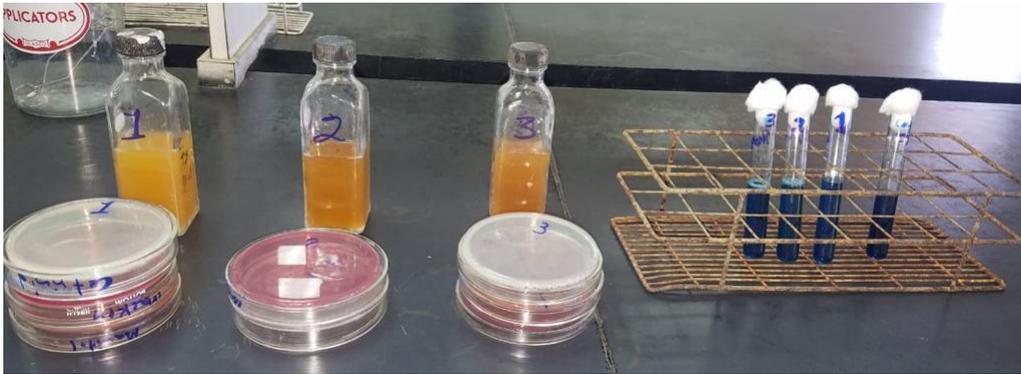
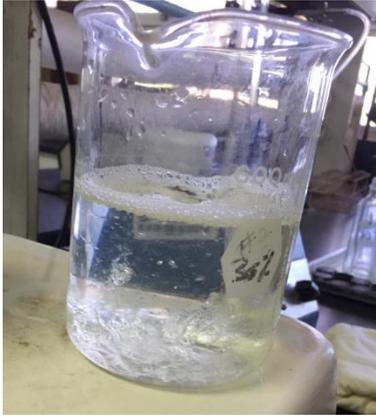
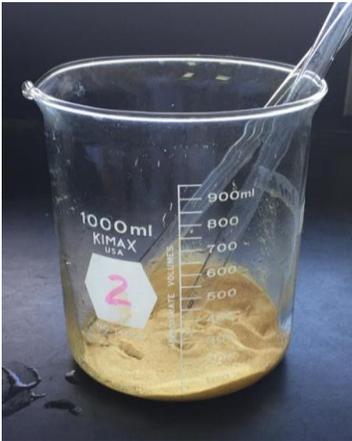


ANEXO 3. Procedimiento





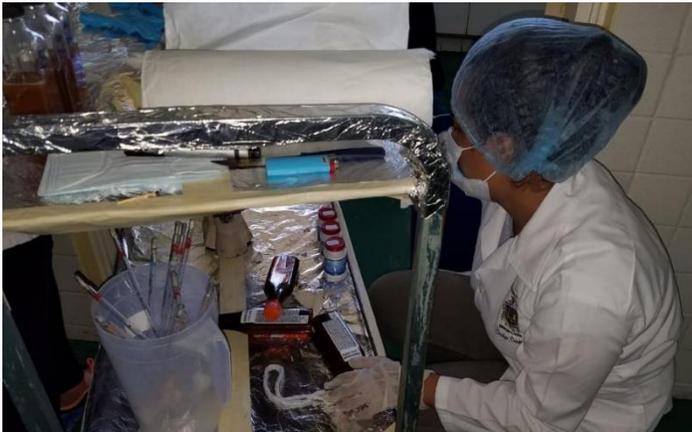
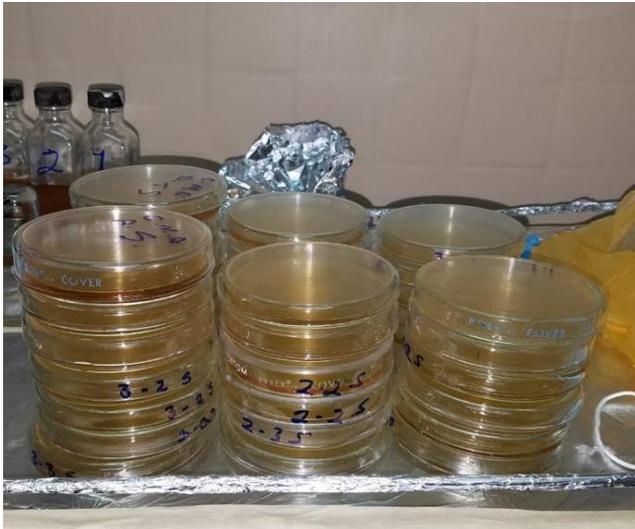
ANEXO 4. PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO





CUARTO DE SIEMBRA

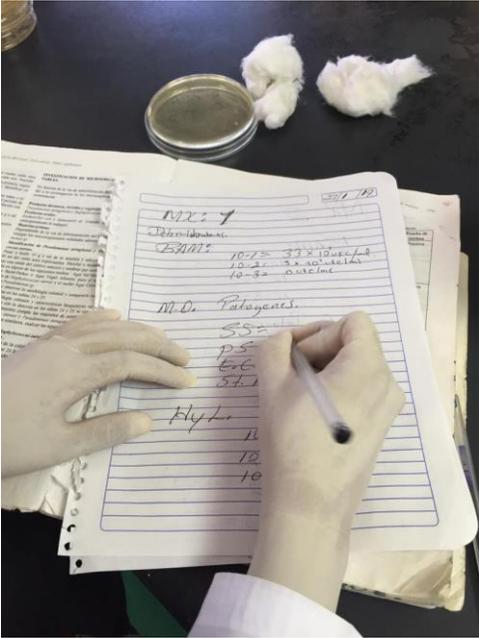






CONTADOR DE COLONIAS







RAYADO DE AGARES





PERIODO TRANSCURRIDO DE CRECIMIENTO

