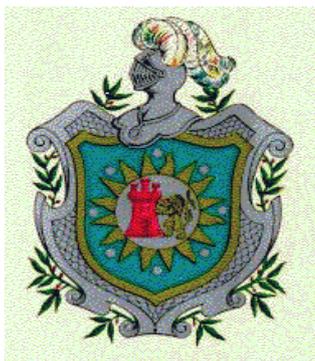


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA.
UNAN - LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
ESCUELA DE FARMACIA**



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

**ANALISIS MICROBIOLOGICO DE FITOFÁRMACOS NO
OBLIGATORIAMENTE ESTERILES ELABORADOS POR EL
LABORATORIO ECOLIFE.**

AUTORES:

**BR. NADIA RENE ARGUELLO GALLO.
BR. YESSENIA MARIA MARTINEZ ULLOA.**

TUTOR:

LIC. GLORIA HERRERA.

Marzo 2004.



INDICE

I-	Resumen.....	3
II-	Tema.....	4
III-	Introducción.....	5
IV-	Objetivos.....	6
V-	Marco Teórico.....	7
	1- Buenas prácticas de manufactura de fitofármacos.....	7
	2- Buenas prácticas agrícolas para plantas medicinales.....	8
	3- Técnicas de secado de plantas medicinales.....	9
	4- Fitoterapia.....	10
	5- Fitofármaco.....	11
	6- Formas de presentación de los productos no obligatoriamente estériles.....	13
	7- Factores determinantes de la calidad microbiológica de los fitofármacos.....	13
	8- Análisis microbiológico.....	13
	9- Clasificación de las bacterias.....	14
	10- Recuento de microorganismos aerobios viables totales.....	18
	11- Límite microbiano.....	22
	12- Límite de contaminación microbiana en materiales de plantas....	22
	13- Medios de cultivo.....	24
VI-	Hipótesis.....	27
VII-	Diseño metodológico.....	28
VIII-	Resultados.....	40
IX-	Análisis de resultados.....	43
X-	Conclusión.....	44
XI-	Recomendaciones.....	45
XII-	Bibliografía.....	46
XIII-	Anexos.....	48



RESUMEN

La utilización de límite Microbiano como método de análisis para productos terminados con fines terapéuticos es importante , no solo por que a través de este se determina la presencia y cantidad de microorganismos en estos; sino por que también se puede garantizar la calidad de los mismos por medio de la aceptación o rechazo que se le debe dar a cada producto.

Hasta el momento no existen estudios dirigidos a realizar controles microbiológicos a productos elaborados a base de plantas medicinales razón por la cual el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la calidad microbiológica de productos no obligatoriamente estériles elaborados por el laboratorio Ecolife en el que utilizamos el ensayo de Límite Microbiano obteniendo resultados satisfactorios ya que siete de los productos analizados cumplieron con las especificaciones descritas por la Farmacopea de referencia, siendo estos aceptados ; por el contrario una de las muestras analizadas fue rechazada por encontrarse concentraciones de Bacterias Aerobias Mesófilas mayores a las especificadas.



TEMA

**Análisis Microbiológico de Fitofármacos no
obligatoriamente estériles elaborados por el laboratorio
Ecolife**



INTRODUCCION

Durante mucho tiempo, se han utilizado las plantas medicinales para curar diferentes patologías, en forma de remedios caseros. Con el paso de los años y en la necesidad del hombre por mejorar su calidad de vida, ha logrado extraer los principios activos de las plantas y convertirlos en Fitofármacos siendo éstos, productos con una actividad suave y moderada, con márgenes terapéuticos relativamente amplios, que dan lugar a tratamientos menos agresivos.

Los Fitofármacos no son inocuos, tienen un efecto terapéutico sobre el ser humano, he implican riesgos cuando se elaboran y emplean de forma inapropiada; por ello se deben de realizar estrictos controles de calidad, destinados a asegurar en la medida de lo posible la idoneidad de estos productos usados en nuestro país. ⁽¹⁾

Es importante que los Fitofármacos estén libres o bien tengan un bajo contenido de microorganismos , ya que la presencia de estos en altas concentraciones debe ser juzgado como potencialmente peligroso para la salud; por ello la calidad microbiológica esta determinada en gran medida desde el cultivo y cosecha de la planta hasta su procesamiento en la industria farmacéutica, donde en esta última se debe tener especial cuidado, ya que puede presentarse el problema de la contaminación de dichos producto por la presencia de microorganismos patógenos provenientes del ambiente y del personal que esta relacionado con las áreas de contaminación controlada. ⁽¹⁾

El presente trabajo se llevó a cabo en vista que los fitofármacos son considerados como productos de uso frecuente en la población, por lo que se determinó la calidad microbiológica de los mismo ya que aunque estos son seguros, también están expuestos a la contaminación bacteriana.



OBJETIVO GENERAL

1- Realizar análisis microbiológico de fitofármacos no obligatoriamente estériles elaborado por el laboratorio Ecolife.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1- Determinar límites microbianos a los fitofármacos en estudio.

2- Verificar la presencia de microorganismos presentes en productos terminados.



1.- Acerca de las buenas prácticas de manufactura de fitofármacos.

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

Presentamos un resumen de los aspectos relacionados con el control de calidad considerados en las pautas adicionales a las buena prácticas de manufactura conformadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). ⁽²⁾

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

- Nombre botánico.
- Detalles de la fuente de la planta (lugar de origen, fecha de cosecha, método de cosecha, pesticidas empleados, etc.).
- Parte de la planta utilizada.
- En caso de planta seca, debe especificarse el sistema de secado.
- Descripción macro y micromorfológica.
- Ensayo de identificación, en el caso que sea posible, de los ingredientes activos o marcadores.
- Evaluación de los componentes de actividad terapéutica conocida o de marcadores.
- Métodos para determinar la posible contaminación con pesticidas y límites aceptables.
- Ensayos para la determinación de contaminación microbiana, incluyendo aflatoxinas e infestación por placas y límites aceptados.
- Ensayos de metales pesados y adulterantes. ⁽²⁾

Cualquier tratamiento utilizado para reducir la contaminación debe ser documentado. Los detalles del proceso deben ser reflejados, así como los límites de los residuos. ⁽²⁾



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

El ensayo de control debe ser tal que refleje la determinación cualitativa y cuantitativa de la composición de los ingredientes activos y las especificaciones son dadas utilizando marcadores si se desconocen los constituyentes activos, de lo contrario, deben especificarse y determinarse cuantitativamente. ⁽²⁾

Si el producto final contiene más de una materia vegetal o preparaciones de diversas drogas vegetales y no es posible la determinación cuantitativa de cada ingrediente, se efectúa la evaluación de la mezcla total. ⁽²⁾

2.- Buenas Prácticas Agrícolas para Plantas Medicinales.

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

El material procedente de plantas medicinales tienen normalmente un gran número de bacterias y mohos, con frecuencia provenientes del suelo. Dentro de la gran variedad de bacterias y hongos provenientes de la microflora propia de las plantas, casi siempre predominan las bacterias aerobias formadoras de esporas. Además, las practicas de cultivo manejo y producción, pueden causar contaminación y crecimiento microbiano adicional. La determinación de *Escherichia coli* y de mohos puede ser un indicativo de la calidad de las técnicas de producción y cosecha así como las del secado. ⁽³⁾



3.- Técnicas de Secado de Plantas Medicinales:

Las plantas medicinales durante su crecimiento o en los procesos de transformación (secado, extracción), y de almacenaje están expuesta a diversos factores ambientales que pueden considerarse contaminante : Ataques de microorganismos e insectos, pesticidas, polvo, etc. ⁽⁴⁾

El secado y extracción de las drogas vegetales comporta que los contaminantes presentes se conviertan en residuos y se requiera una atención especial desde el punto de vista microbiológico ya que los microorganismos pueden incrementarse en condiciones de secado lento y húmedo; debe tenerse en cuenta la posible formación de toxinas procedentes de la acción de hongos y bacterias en condiciones adecuadas. Es por eso que se requiere un control adecuado del proceso de secado para lo cual existen una serie de técnicas de acuerdo al fin que se les va a dar, ya que se garantiza la conservación de las sustancias activas en su máximo grado de efectividad. ⁽⁴⁾

El secado de una planta no es mas que el proceso de extraer la humedad que contiene para evitar que se pudra, enferme o pierda las sustancias activas. ⁽⁴⁾

Si el tiempo de secado es excesivo se corre el riesgo de que la planta se reduzca a polvo perdiendo las sustancias activas ; por otro lado un tiempo escaso puede provocar que la humedad que aun contienen las haga enmohecer o pudrirse. ⁽⁴⁾

Existen dos tipos de secado:

- Calor natural.
- Calor artificial.

Siendo el calor natural el sistema de secado mas adecuado y el que da los mejores resultados, pero a la vez tiene la desventaja que se obtiene un rendimiento inferior por estar limitado a la época veraniega. ⁽⁴⁾



4.- La Fitoterapia:

Es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico. La fitoterapia debe interpretarse como la utilización

terapéutica de productos con una actividad suave o moderada, con márgenes terapéuticos relativamente amplios y que dan lugar a tratamientos menos agresivos. Por tanto la fitoterapia utiliza fitofármacos y principios activos aislados de las plantas. Estos productos deberán ser convenientemente preparados, dándoles la forma farmacéutica más adecuada para su administración al paciente. ⁽⁵⁾

Esta tiene una indiscutida importancia en la medicina actual y la resistencia a su uso es cada vez más sustentada en el desconocimiento que en argumentos provenientes de una buena utilización del método científico. ⁽⁵⁾

No obstante, no debemos agrandar ni minimizar los recursos y alcances de la fitoterapia ni de los fitofármacos. Debemos saber reconocer cuál es el lugar de importancia que a la fitoterapia le corresponde en la farmacoterapéutica moderna y este es sin duda aquél para el cual se ha logrado demostrar su utilidad; cada fitofármaco debería tener su importancia de acuerdo a su eficacia y seguridad terapéutica. ⁽⁵⁾

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

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



Estos estudios van aportando paso a paso las evidencias que aseguran los mecanismos de acción a través de los que se ejerce la acción terapéutica y comprueban su eficacia y seguridad en uso. ⁽⁶⁾

5.- Fitofármaco:

Son medicamentos obtenidos mediante modernas tecnologías de producción industrial y que contienen un extracto estandarizado de una planta que constituye su componente biológicamente activo. Estos medicamentos se producen en varias formas tales como tabletas grageas cápsulas y líquidos. ⁽⁶⁾

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

“Productos medicinales acabados y etiquetados cuyos ingredientes activos están formados por partes aéreas o subterráneas de plantas u otro material vegetal, o combinaciones de éstos, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales. Por material vegetal se entienden: jugos, resinas, aceites vegetales y cualquier otra sustancia de naturaleza semejante. Los medicamentos herbarios pueden contener excipientes además de los ingredientes activos. Si el material se combina con sustancias activas definidas desde el punto de vista químico, inclusive constituyentes de plantas aislados y químicamente definidos, no se consideran medicamentos herbarios.” ⁽⁶⁾

A pesar que durante un tiempo los fitofármacos se encontraron en un segundo plano, en las últimas dos décadas han vuelto a tener una mayor presencia en la terapéutica. ⁽⁷⁾

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



Muy por el contrario, está cada vez mas establecido que actúan por las mismas vías que lo hacen los medicamentos llamados convencionales y no pocas veces, a través de varias vías simultáneas, en lo que se denomina acción sinérgica. ⁽⁶⁾

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

- Autenticación de la especie botánica empleada.
- Partes de la planta que son utilizadas.
- Factores ambientales.
- Condiciones de la cosecha.
- Contaminación de ingredientes herbarios.
- Buenas prácticas de manufactura.
- Estandarización de los extractos.
- Bases de comparación de los fitofármacos. ⁽⁶⁾

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

- Las cada vez más numerosas evidencias de los graves efectos secundarios en fármacos de síntesis.
- El avance químico, farmacológico y clínico del conocimiento en torno a los fitofármacos.
- El desarrollo de nuevas formas de preparación y de administración de los fitofármacos.
- El desarrollo de métodos y técnicas que garantizan un mejor control de calidad.
- El aumento de la automedicación ya que los productos fitofármacos son, en general menos peligrosos y por tanto más aptos para la automedicación. ⁽⁷⁾



6.- Formas de presentación de los productos no obligatoriamente estériles:

- Pomadas.
- Gel.
- Extractos.
- Tinturas.
- Jarabes.
- Simples.
- Te aromáticos. ⁽⁸⁾

7.- Factores determinantes de la Calidad Microbiológica de los Fitofármacos.

7.1.- Intrínsecos:

- Naturaleza de la planta y barreras naturales.
- Estructura de la planta.
- Composición de la planta(compuestos antimicrobianos).
- Contaminación intracelular microbiana.

7.2. Extrínsecos:

- Clima.
- Humedad.
- Ubicación / Posición.
- Método de cosecha.
- Postcosecha.
- Estado físico.
- Tratamiento tecnológico.
- Empaque / Almacenaje.
- Contaminación bacteriana exógena. ⁽⁹⁾

8.- Análisis Microbiológico.

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



Para este tipo de cultivo es indispensable la preparación de soluciones, u otras formas de los materiales que los microorganismos pueden utilizar como alimento. ⁽⁸⁾

8.1- Mesófilos:

Muchas especies del suelo, del agua, del cuerpo crecen bien a temperaturas que oscila entre 10 y 45 grados C (la temperatura del cuerpo humano es de 37 grados C). No obstante sus temperaturas óptimas de crecimiento son de cerca de 30 a 45 grados C y varían según las especies. Las que se desarrollan bien a tales temperaturas se denominan Mesófilas (del griego meso = mitad o medio, philie = elegir). ⁽⁸⁾

8.2- Aerobios:

Microorganismo capaz de crecer o metabolizar en presencia de oxígeno libre. ⁽⁸⁾

8.3- Anaerobios:

Se dice del microorganismo capaz de crecer o de metabolizar en ausencia de oxígeno libre, puede ser facultativo u obligado (es decir morirá en presencia de oxígeno). ⁽⁸⁾

9.- Clasificación de las bacterias:

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, géneros, etc. ⁽⁸⁾

Para nuestro estudio resultan de interés las familias: **Enterobacteriaceae, Micrococaceae, Pseudomonadaceae y los Hongos verdaderos.** ⁽⁸⁾

9.1- Familia Enterobacteriaceae:

Los microorganismos integrantes de esta familia se distinguen porque en su mayoría habitan en el conducto intestinal del hombre y animales inferiores de ahí su nombre. ⁽¹⁰⁾



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

bioquímica, o una propiedad fisiológica única para identificar a cualquier miembro de la familia. ⁽¹⁰⁾

Forma bacilar no esporógena, son gram negativos, aerobios, algunas especies son patógenas primarias peligrosas, que ocasionan fiebre tifoidea , disentería, diarreas infantiles e infecciones del conducto urinario y otros órganos, además existen especies para parásitas de plantas que provocan marchites y podredumbres ligeras. ⁽¹⁰⁾

Los géneros que integran la familia Enterobacteriaceae son: Escherichia, Aerobacter, Salmonella, Serratia, Erwinia, Proteus, Shigella, Klebsiella, Pectobacterium. ⁽¹⁰⁾

A continuación describiremos los de nuestro interés:

9.1.1 Género Escherichia.

Es un genero muy esparcido en la naturaleza entre sus especies la mas importante es la *Escherichia coli* que es la especie mas genuinamente fecal, y se encuentra siempre en el conducto intestinal del hombre y de los animales, es por eso que su presencia en los alimentos o en las aguas potables puede ser indicio de contaminación fecal. ⁽⁸⁾

La *Escherichia coli* puede causar mas problemas graves al invadir la vejiga urinaria y la pelvis renal produciendo cistitis, y pielitis respectivamente. ⁽¹⁰⁾
Para la identificación de *Escherichia coli* mediante pruebas bioquímicas. (Ver anexo 5)



9.1.2 Diferenciación de los coliformes .

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

Habiendo obtenidos cultivos puros satisfactorios, ya sea con el método estándar ya con el de membrana de filtro, se realizan las pruebas de producción de indol, la de la reacción del Rojo de Metilo, la reacción de Voges _ Proskauer y la capacidad para utilizar el Citrato Sódico como única fuente de carbono. ⁽⁸⁾

Fórmula IMViC = se utiliza a menudo una regla mnemotécnica (para ayudar a la memoria), IMViC, con más o menos signos para expresar las diferencias entre los microorganismos coliformes por medio de una fórmula: La I se refiere a la reacción del Indol; la M a la reacción del Rojo de Metilo; la V , a la prueba de Acetil Metil _ Carbonil (prueba de Voges _ Proskauer); la I se incluye con finalidad eufónica y la C se refiere al crecimiento en una sola solución mineral que contenga citrato como fuente única de carbono. ⁽⁸⁾ (Ver anexo 2).

Así, un microorganismo del grupo coliforme designado como IMViC ++-- sería *Escherichia coli*, puesto que éste da positivas las reacciones del indol y del rojo el metilo, pero negativas las reacciones de voges _ proskauer y del citrato. ⁽¹⁰⁾

9.1.3- Género Salmonella.

El género Salmonella, consiste en células de forma bacilar habitualmente móviles y capaces de utilizar el citrato como fuente de carbono.; la mayoría de estas cepas son aerógenas. ⁽¹⁰⁾

Además uno de los más importantes de la familia reúne muchas especies patógenas que provocan enfermedades tales como: tifus, alteraciones gastrointestinales (Salmonelosis), septicemia (invade la sangre), fiebres tifoideas y para tifoideas, etc. ⁽¹⁰⁾



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

Dentro de las características diferenciales de la *Salmonella* utilizaremos como ejemplo la cepa *Salmonella* *Thypi*, siendo esta: xilosa variable: tehalosa y sulfuro de Hidrógeno positivo; arabinosa, agar citrato y gas en dextrosa, indol negativo. (Ver anexo 4).⁽¹⁰⁾

9.2- Familia Micrococaceae:

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

La familia incluye los géneros *Micrococcus*, *sarcinas*, *Staphylococcus*, *Methanococcus* y *Peptococcus*.⁽¹⁰⁾

9.2.1- Géneros *Staphylococcus*.

Este género microscópicamente suele confundirse con *Micrococcus*, sus representantes forman masas irregulares, aunque casi siempre se agrupan en racimos. La diferencia entre estos géneros se aprecia en la capacidad que tiene *Staphylococcus* de fermentar o utilizar la glucosa, el manitol y el piruvato en condiciones anaerobias. De ahí se plantea que esta familia agrupa microorganismos aerobios facultativos.⁽⁸⁾

Se encuentra frecuentemente en la piel, membranas, mucosa de nariz y boca, heridas infectadas, etc. Donde aparecen en grandes cantidades aún en condiciones normales.⁽¹⁰⁾

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.⁽¹⁰⁾



Dentro de las características diferenciales podemos mencionar las correspondientes al *Staphylococcus epidermidis* las cuales son las siguientes: No fermentan el manitol, ni produce coagulasa, toxina alfa o lipasa; la licuefacción de la gelatina es lenta o no existe; la hemólisis es discreta o ausente. (Ver anexo 6). ⁽¹¹⁾

9.3- Familias Pseudomonadaceae:

Son de origen marino y toleran altas concentraciones de sal. Numerosas especies de esta familia producen pigmentos azules, verdes y amarillos solubles en el agua y difusibles; y a veces fluorescentes. ⁽¹⁰⁾

9.3.1- Género Pseudomonas.

Es una bacteria polifórmica gramnegativa, móvil, es un aerobio obligado, se desarrolla a la temperatura óptima de 37° C pero puede crecer incluso a los 40 _ 41° C. Sucumbe a 60° C en 1 hora, es sensible a los desinfectantes. ⁽¹⁰⁾

En condiciones naturales la *Pseudomona aeruginosa* habita en el suelo, el agua y las plantas, pero a veces se aísla en los pacientes con quemaduras, así como heridas infectadas y en la uretra. ⁽⁸⁾

En el hombre provoca procesos supuradas locales o generalizados: otitis, pielitis, cistitis, queratitis, meningoencefalitis y septicemia, contamina las superficies de la heridas y quemaduras. Los niños menores de edad y debilitados son los más susceptibles a la infección por *Pseudomonas*. En los enfermos afectados por esta bacteria la pus y las vendas se colorean de azul verdoso. ⁽¹⁰⁾

Para la identificación de *Pseudomonas aeruginosas*. (Ver anexo 3)

10.- Recuento de microorganismos aerobios viables totales:

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



El recuento se realiza bajo condiciones que eviten cualquier riesgo de contaminación accidental del producto examinado. Las precauciones tomadas para evitar contaminaciones no deben afectar a ninguno de +los microorganismos cuya presencia puede ser puesta de manifiesto en el ensayo. ⁽⁸⁾

Se emplea una muestra de 10 g ó 10 ml del producto a examinar con las precauciones prescritas anteriormente. Para obtener la cantidad requerida se mezclan varias porciones seleccionadas al azar de la masa del producto. Según la naturaleza de la muestra que se examine, ésta se diluye, se suspende o se emulsiona en un líquido apropiado. ⁽⁸⁾

Se deben utilizar series de diluciones apropiadas a fin de obtener un número de unidades formadoras de colonia que esté dentro de los límites recomendados por el método utilizado. ⁽¹⁰⁾

10.1- METODO POR DILUCIÓN.

10.1.1- Diluciones Seriadadas:

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

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

Por ejemplo en una dilución en serie decimal supongamos que se observa crecimiento en el tubo que recibió la dilución 1:1,000 pero no lo hay en el que contiene la dilución 1:10,000. En tal caso, en la muestra de leche examinada existen teóricamente entre 1,000 a 10,000 organismos por mililitros(viable en esa clase de caldo y bajo esa condición ambiental). ⁽⁸⁾



10.2.- Recuento por el Método más Probable:

Se prepara una serie de doce tubo conteniendo en cada tubo de 9 a 10 ml de medio líquido. A cada uno de los primeros tubos se les añade 1 ml del producto diluido, disuelto y homogenizado en la proporción 1:10, como se indicó anteriormente. A cada uno de los tubos siguientes se le añade 1 ml de la dilución 1:100 del producto. A cada uno de siguientes tubos se les añade 1 ml de dilución 1:1,000 del producto y a los últimos de los tubos se les añade 1ml de diluyente. Se incuban todos los tubos a una temperatura de 30 a 35 grados C durante 5 días al menos. Los 3 últimos tubos no deben presentar crecimiento microbiano. Si por la naturaleza del producto a examinar la lectura de los resultado es difícil o incierta se prepara un subcultivo en medio líquido o en medio sólido y se procede a la lectura de los resultados después de un nuevo periodo de incubación. Se determina el número más probable de microorganismo por gramos o por mililitro de producto a examinar. ⁽⁸⁾ (Ver anexo 1)

10.2.1- Interpretación de los resultados:

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

10^2 microorganismos _ límites Máximo de aceptación : 5×10^2
 10^3 microorganismos _ límites Máximo de aceptación : 5×10^3 ⁽⁸⁾

10.3- Recuento de microorganismos revivificables:

Microorganismos aerobios son aquellos que se desarrollan bajo condiciones aerobias.

El recuento total de microorganismos aerobios ,es el índice más comúnmente utilizado para conocer el estado microbiológico de un alimento. Altos recuentos de mesófilos indican materia prima contaminada, condiciones de fabricación poco higiénicas o mal tratamiento térmico⁽⁸⁾.



Altos recuentos totales de microorganismos no patógenos tienen también un significado sanitario. Se considera el recuento total de aerobios como un índice de las condiciones sanitarias de muchos alimentos. ⁽⁸⁾

El recuento de bacterias mesófilas aerobias se eleva proporcionalmente en la medida en que se descuidan las condiciones higiénicas en que se obtiene la muestra, se expone esta a diferentes fuentes de contaminación puede ser equipos sucios, el polvo, manipulación inadecuada, etc. ⁽⁸⁾

10.4.- Crecimiento de colonias:

Las células que forman una colonia sobre la superficie de un medio sólido como el agar nutriente, encuentran un ambiente muy distinto del que tienen las células libres bañadas en un medio líquido. A menos que la superficie del medio sólido este muy húmeda o que los microorganismos sean muy móviles, la colonia se ve obligada a crecer en un área muy limitada. ⁽⁸⁾

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

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

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

- d. Las colonias demasiado hacinadas compiten entre ellas y unas sobrepasan en crecimiento a las otras. ⁽⁸⁾



11.- Limite Microbiano.

11.1- Concepto:

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 mesófilos, hongos filamentosos y levaduras; así como la investigación de microorganismos objetables en dicho estudio. ⁽¹²⁾

11.2- Factores que afectan el Límite Microbiano:

11.2.1- Temperatura 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.

11.2.2- pH de los medios de cultivo:

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

11.2.3- 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 ya que este puede interferir en el crecimiento de los microorganismos o provocar resultados erróneos.

11.2.4- El tiempo transcurrido desde la primera dilución hasta su incorporación en los medios de cultivos no debe exceder de una hora. ⁽⁸⁾

12.- Límites de Contaminación Microbiana en Materiales de Plantas Medicinales.

Se establecen límites diferentes de acuerdo al uso del material y al material en sí.



* Para contaminación de material vegetal crudo que será sometido a procesos posteriores (incluyendo descontaminación adicional por medios físicos o químicos), se dan límites, para material vegetal no tratado, cosechado en condiciones de higiene aceptables:

- Escherichia coli* : máximo 10^4 por gramo.
- Hongos : máximo 10^5 por gramo. ⁽³⁾

* Para materiales de plantas que tienen que ser pretratadas (usar agua hirviendo para té de hierbas o infusiones) o si el material es usado en forma tópica. ⁽³⁾

Por gramo:

- Máx 10^7 Bacterias aeróbicas.
- Máx 10^2 Hongos y Levaduras
- Máx 10^2 *Escherichia coli*
- Máx 10^2 Otras entero bacterias
- No *Salmonellas*. ⁽³⁾

Exigencia:

Exigencias de higiene microbiológicas a productos terminados de fitofármacos.(según DAB).

12.2- Preparaciones para uso interno.

Exigencia por gramo ó ml:

- Bacterias Aerobias Mesófilas: < 5×10^7
- Recuento de hongos y levaduras: < 5×10^4
- Otras enterobacterias : < 10^1
- Escherichia coli* : Ausencia
- Staphilococcus aureus* ; Ausencia.
- Salmonella* : Ausencia.
- Pseudomona aeruginosa*: Ausencia



12.3.- Límites de contaminación aceptadas por WHO(OMS) Quality control methods.

12.3.1.- Para uso interno:

- Bacterias Aerobias Mesófilas: $<10^5$ /g ó ml.
- Recuento de hongos y levaduras: $<10^3$ /g ó ml.
- Otras enterobacterias $<10^3$ /g ó ml.
- *Escherichia coli* : Ausencia
- *Staphylococcus aureus* : Ausencia.
- Salmonella : Ausencia.
- *Pseudomona aeruginosa*: Ausencia. ⁽¹⁾

12.3.2.- Para uso externo:

- Bacterias Aerobias Mesófilas: $<10^2$ /g ó ml.
- Recuento de hongos y levaduras: $<10^2$ /g ó ml.
- Otras enterobacterias : $<10^1$ /g ó ml.
- *Escherichia coli* : $<10^1$ /g ó ml.
- *Staphylococcus aureus* : Ausencia.
- Salmonella : Ausencia.
- *Pseudomona aeruginosa*: Ausencia. ⁽¹⁾

13.- MEDIOS DE CULTIVOS.

Prepara los medios de cultivos a partir de mezcla deshidratadas comerciales respetando estrictamente las indicaciones del fabricante.

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

Disolver los sólidos solubles en el agua calentar hasta disolución completa. Determinar el pH a $25 \pm 2^\circ$ C y ajustar si es necesario con soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, según sea el caso.

Los medio de cultivos deben esterilizarse a 121° C durante 15 minutos a menos que en la formulación se indiquen otras condiciones. ⁽¹²⁾



13.1- Solución salina

Cloruro de sodio	8.5g
Agua destilada	1000 ml.

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

13.2.- Agar Soya Trypticaseína

Digerido pancreático de caseína	20.0g
Lecitina de soya	5.0g
Polisorbato 20	40 ml
Agua destilada	960 ml.
pH después de esterilizar	7.0 \pm 0.2

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

13.3.- Agar Ceftrimida .

Digerido pancreático de gelatina	20.1g
Cloruro de magnesio	1.4g
Sulfato de potasio	10.1
Agar	13.6g
Bromuro de etil trimetilamonio (ceftrimida)	03.3g
Glicerol	10.0ml g
Agua destilada	1000 ml
pH después de esterilizar	7.2 \pm 0.2

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

13.4.- Caldo lactosado

Extracto de carne	3.0gr
Dirigido pancreático de gelatina	5.0g
Lacto	5.0g
Agua destilada	1000 ml.
pH después de esterilizar	6.9 \pm 0.2

Después de esterilizar enfriar el medio de cultivo lo más rápido posible.



13.5.- Caldo selentino – cistina.

Digerido pancreático de caseína	5.0g
Lactosa	4.0g
Fosfato de sodio	10.0 g
Selenito asido de sodio	4.0 grs.
I-cistina	0.01g
Agua destilada	1000ml
pH final	7.0 ± 0.2

Calentar por medio de una corriente de vapor durante 15 minutos. No esterilizar.

13.6.- Agar Mac Conkey

Digerido pancreático de gelatina	17.0 g
Digerido pancreático de caseína	1.5g
Digerido péptico de tejido animal	1.5 g
Lactosa	10.0g
Mezcla de sales Biliares	1.5g
Cloruro de sodio	5.0g
Agar	12.5g
Rojo neutro	0.03g
Cristal violeta	0.001g
Agua destilada	1000ml
pH después de esterilizar	7.1 ± 0.2

13.7.- Agar Dextrosa Sabouraud

Dextrosa	40.0 g
Digerido péptico de tejido animal	5.0 g
Digerido pancreático de caseína	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 ml
pH después de esterilizar	5.6 ± 0.2 ⁽¹³⁾



HIPOTESIS

Los productos no obligatoriamente estériles, elaborados por el laboratorio Ecolife cumplen con los límites microbianos establecidos por la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.



DISEÑO METODOLOGICO

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

Población de estudio: Todos los fitofármacos no obligatoriamente estériles elaborados por el Laboratorio Ecolife.

Muestra: La muestra consiste en ocho fármacos pertenecientes a los productos no obligatoriamente estériles elegidos al azar de un total de diez fitofármacos de este tipo que produce el laboratorio.

Muestreo: los productos para el análisis fueron obtenidos a través de su compra en farmacias de productos naturales de la ciudad de León.

Nombre del fármaco.	Presentación
• Apazote-life.	Jarabe 120 ml.
• Orégano.	Tintura 60 ml.
• Ovaril.	Tintura 60 ml.
• Sen de Alejandría.	Extracto 60 ml.
• Jengibre.	Jarabe 120 ml.
• Carao-life.	Jarabe 120 ml.
• Guayaba.	Jarabe 120 ml
• Fat Reductor.	Gel 60 g.

Variable de estudio: Limite Microbiano.

Area de Estudio: El área de estudio corresponde al Departamento de Análisis de Drogas, Medicamentos y Tóxicos en el área de Control Microbiológico en la U.N.A.N.- León.

Fuente de información: * Monografías.
* Libros.
* Internet.
* Farmacopeas.



Criterios de selección:

-Tomamos como muestra los productos elaborados por el laboratorio Ecolife específicamente los no obligatoriamente estériles por que es el que produce mayor cantidad de fitofármacos de esta clase.

- Debido a que los productos elaborados por este laboratorio son los más vendidos en las farmacias de productos naturales.

Procedimiento de recopilación de la información: la información fue recopilada en la Biblioteca del Complejo Docente de la salud a través de las fuentes de información antes mencionada, tomando de estas lo mas relevante para llevar a cabo el desarrollo de nuestro estudio.

LIMITE MICROBIANO APLICADO A LOS MEDICAMENTOS NO OBLIGATORIAMENTE ESTERILES

TÉCNICA OPERATORIA :

- 1.- Tratamiento Previo de las muestras : se usará alcohol etílico 70% v/v para limpiar la superficie de los envases esperando a que se seque totalmente para iniciar las determinaciones.
- 2.- Toma de muestras (Solución madre de la muestra) : De los envases individuales se pesan o se miden en condiciones asépticas 10g ó ml. De un producto y se transfieren a un frasco que contienen solución salina Buffer pH = 7 +- 0.1 y solución 20 % Tween 80 estéril. Previamente calentadas en baño maría a 45° C. Se agita suavemente para lograr la homogenización de la porción de ensayo durante 15 minutos.
- 3.- **Determinación de la actividad inhibitoria de la muestra a analizar :**

Para validar la prueba de límite microbiano aplicada a productos no obligatoriamente estériles se necesita demostrar que el producto no posee actividad antimicrobiana que impiden el crecimiento de microorganismos.



Procedimientos :

- 3.1 Tome 8 frascos con 20 ml. De caldo D.C.S. estéril y añada a 4 de ellos 1 ml. De la solución madre del producto, rotúlelos como A..C Y D .
- 3.2 A los otros 4 frascos con restante rotúlelos como E,F,G y H estos no llevarán solución madre.
- 3.3 Inocule dos tubos de ensayo con 1 ml. De suspensión microbiana, previamente preparada que contenga 10^3 UFC/ml.

Tubo de ensayo A y E :	<i>Staphylococcus aureus.</i>
Tubo de ensayo B y F:	<i>Pseudomona aerugionosa.</i>
Tubo de ensayo C y G:	<i>Escherichia coli.</i>
Tubo de ensayo D y H:	<i>Salmonella sp.</i>
- 3.4 Incube todos los tubos de ensayos por 24 – 48 Horas a 32-35° C
- 3.5 Realice la verificación de la esterilidad del medio usado.
- 3.6 Revise las lecturas.
- 3.7 Interpretación de los resultados.

Los tubos A,B,C y D deben tener un crecimiento en condición igual al de su homólogos por microorganismos E; F, G y lo cual es índice de ausencia de actividad inhibitoria del crecimiento de los microorganismos a cuantificar.

Si en algunos o todos lo tubos A,B,C Y D hay menos crecimiento que en los controles positivos respectivos, existe un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano el cual se debe contrarrestar.



RECuento DE ORGANISMOS MESOFILICOS AEROBIOS.

Para el recuento de organismos mesófilos aerobios existen dos métodos:

- **Método en placa.**
- **Método en tubo(NMP).**

Siendo el primer método el utilizado en este análisis.

- **Método en placa:**

Efectuar las diluciones decimales necesarias para que 1ml. Contenga entre 30 y 300 UFC/ml.

Inocular por duplicado 1 ml. De cada dilución del producto, en cajas de petri estériles añadir a cada caja de 15 a 20 ml, del medio Agar Soya Trypticaseína ó Agar Soya Trpticaseina- Lecitina de Soya- Polisorbato, previamente esterilizado y mantenido en baño de agua a una temperatura aproximada de 45 a 48° C Con movimientos suaves rotatorios, mezclar la alícuota de la maestra con el medio de cultivo, evitar derramar el líquido. Permitir que el medio de cultivo, solidifique e incubar las placas en posición invertida a $35 \pm 2^{\circ}$ C, durante 78-72 horas. Después del período de incubación contra el número de UFC, auxiliándose de una lupa, Anotar el promedio de colonias por dilución, informar el número de UFC por g ó ml del producto, considerando el factor de dilución de la muestra.

Si no se observa desarrollo de la dilución 1:10, expresar los resultados de la muestra.

Menos de 10 UFC por g ó ml de muestra.

1. Efectuar 3 diluciones decimales:

PRIMERA DILUCIÓN: Se pesan 10g o se toman 10ml de muestra. Se añaden a 90ml del diluyente seleccionado contenido en un erlenmeyer.



SEGUNDA DILUCIÓN: Transferir 1ml de la primera dilución a un tubo de ensayo conteniendo 9ml de solución diluida de peptona-solución salina pH 7.0.

TERCERA DILUCIÓN: Transferir 1ml de la segunda dilución a un tubo de ensayo conteniendo 9ml de la solución diluida de peptona-solución salina pH 7.

1. Simultáneamente inocular por duplicado 1ml de cada dilución producto en platos petri, añadir a cada placa 15-20ml de medio

Agar Tripticaseína, previamente esterilizado y mantenido en baño María a temperatura entre 45- 48°C (para mantenerlo fundido).

2. Con movimientos suave rotatorios mezclar la alícuota de la muestra con el medio de cultivo, evitando que se produzca un derrame. Permitir que el medio solidifique e incubar las placas en posición invertida a 35-37 °C durante 48 a 72 horas.
3. Después del período de incubación contar el número de UFC con ayuda del contador de colonias. Se determina la media o promedio de UFC por cada dilución. Informar el número de UFC por gramo o por ml del producto, considerando el factor de dilución de la muestra.

El producto se acepta si se observan UFC en cantidades menores de 100 UFC por gramo o por ml de muestra en la dilución 1:10 y los resultados se expresan: Menos de 100 UFC/g ó ml de muestra.

B. Recuento de Hongos Filamentosos y Levaduras.

1. Proceder igual como se indica en el Recuento de Organismos Mesófilos Aerobios, con la excepción que se utiliza el medio Agar Dextrosa-Sabouroud- o Agar Dextrosa- Papa. Incubar a 22-25°C durante 5 a 7 días.



2. 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.

El producto se acepta si hay ausencia de colonias o la cantidad existente es menor de 10 colonias por g ó ml de muestra. El resultado se expresa : Menor de 10 colonias por g ó ml de muestra.

C. Determinación de Microorganismos Patógenos.

Pseudomona aeruginosa.

1. Pesar 10g o medir 10ml de muestra con 90 ml de Caldo Digerido de Caseína- Soya. Mezclar e incubar a 35-37°C durante 48 a 72 horas.
2. Examinar el medio visualmente. Si hay crecimiento a partir del caldo hacer una resiembra en Agar Cetrimide e incubar los platos en posición invertida a 35-37°C durante 24 a 48 horas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Si al examinar los platos del paso 2, ninguno contiene colonias el producto a examinar satisface el ensayo. Si aparecen colonias formadas por bacilos Gram negativos , generalmente verdosas y fluorescentes se efectúa la prueba de la oxidasa. Si el resultado de la prueba es positiva el producto no satisface el ensayo, Si el resultado es negativo el producto satisface el ensayo.

Prueba de la Oxidasa (Examen de Pigmentos) Para *Pseudomona aeruginosa* :

Se humedecen pequeña tiras del papel filtro en solución acuosa al 1% de tetrametil- p-fenilendiamina u oxalato, (algunos papeles filtros dan color azul y no deben usarse) el cual se deja secar o se utiliza húmedo.



Se toma una pequeña porción del cultivo joven con un alambre de platino o una varilla de vidrio y se frota sobre el papel filtro .(los cultivos viejos no son confiables). La aparición de un color azul dentro de los 30 segundos siguientes es una reacción positiva a la oxidasa.

Staphylococcus aureus.

1. Pesar 10g o medir 10ml de muestra con 90ml de CALDO DIGERIDO DE CASEINA-SOYA. Mezclar e incubar a 35°C durante 48 a 72 horas.
2. Examinar el medio visualmente. Si hay crecimiento a partir del caldo, hacer una resiembra por estría cruzada en Agar BAIR PARKER e incubar los platos en posición invertida a 35-37°C durante 24 a 48 horas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

La ausencia de crecimiento de microorganismos indica que el producto satisface el ensayo. La aparición de colonias negras de cocos Gram positivos agrupados en racimos y a menudo rodeada de una zona clara, puede constituir un indicio de la presencia de *Staphylococcus aureus*. En este caso se realiza la prueba de la coagulasa para confirmar. Si el resultado de la prueba es positivo el producto no satisface el ensayo. Si el resultado es negativo, el producto satisface el ensayo.

Prueba de la coagulasa: Se añaden 0.2 ml de plasma con oxalato o heparina a 0.8 ml de Caldo Nutritivo sin glucosa en un tubo pequeño. Se siembra con el Sthafilococcus sospechoso y se incuba a 37°C en baño María durante 6 horas. Deben incluirse en la prueba controles conocidos positivo y negativo. El *Staphylococcus aureus* puede formar un coagulo, gelificar todo el contenido del tubo o producir una trama roja de fibrina. En este caso se considera el resultado de la prueba: positivo.

La prolongación de la incubación del tubo con plasma puede dar lugar a la desaparición del coagulo por digestión (fibrinólisis). Por tanto se debe tener mucho cuidado y respetar el tiempo de incubación.



SALMONELLA.

1. Pesar 10 g o medir 10 ml de muestra y añadir a un volumen de 90 ml de Caldo Lactosa e incubar a 35-37°C durante 48-72 horas.
2. Examinar el medio para ver si hay crecimiento (turbidez). Si lo hay agitar el medio y tomar 1ml y añadirlo a tubos de ensayo (2) que contienen 10 ml de Caldo Selenito- Cisteína y Caldo Tetracionato. Mezclar e incubar de 12 a 24 horas a 35 -37°C.
3. Una vez incubado con un asa se toma una muestra a los tubos de ambos caldos y se efectúa una resiembra al menos en dos medios sólidos diferentes. Se puede elegir entre los siguientes: Agar Verde Brillante, Xilosa- Lisine-Dexosicolato y Agar Citrato- Dexosicolato. Invertir los platos e incubar a 35-37°C, durante 48-72 horas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

La aparición de cultivos con las siguientes características indica la probable presencia de bacterias del genero Salmonella:

Agar citrato- Dexosicolato: Colonias bien desarrolladas, incoloras.

Agar Xilosa- Lisina- Dexosicolato: Colonias bien desarrolladas rojas que pueden presentar o no un centro negro.

Agar Verde Brillante: Colonias pequeñas transparentes, incoloras o de una coloración rosa hasta blanca opaca, a menudo rodeada de una zona rosa o roja.

Si al examinar los platos la colonias formadas no presentan las características descritas anteriormente se deduce que hay ausencia de Salmonella.

Escherichia coli.

1. Pesar 10g o medir 10ml de muestra y añadir a un volumen de 90ml de Caldo Lactosa e incubar a 35-37°C durante 48 a 72 horas.



2. Examinar el medio para ver si hay crecimiento (turbidez). Si lo hay transferir con un asa al agar Mac Conkey. Incubar de 48 a 72 horas a 35-37°C.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Si al examinar los platos se observan colonias de color rojo generalmente sin mucosidad integrada por bacilos gram negativos, esto indica la probable presencia de *Escherichia coli*.

Esta presencia puede ser confirmada por la prueba IMVIC que se describe a continuación:

Se toman las colonias sospechosas de *Escherichia coli* que se cultiva en los cuatro tubos que contienen el medio de cultivo respectivo para cada prueba. Se incuban por 24 horas a 37°C.

Prueba de Indol (I) : Detectar el indol en el medio de cultivo con dimetilaminobenzaldehído. Se agrega al tubo unas gotas del reactivo Kovac. Se espera un minuto. Si aparece un color rojo la prueba es positiva. Si aparece un color amarillo o café la prueba es negativa.

Prueba de Rojo de Metilo (M) : Se añade indicador Rojo de Metilo al medio Caldo-Glucosa. Si aparece un color rojo la prueba es positiva. Un color amarillo indica que la prueba es negativa.

Prueba de Vogues-Proskaver (V) : Es una prueba química para acetona. El medio contiene caldo glucosa. Después de la incubación se agregan unas gotas de reactivo alfa naftol. Si aparece un color rojo indica que la prueba es positiva. En caso contrario la prueba es negativa.

Prueba de Citrato (C) : Se utiliza para evaluar el citrato como única fuente de carbono. Si en el tubo con citrato hay un viraje de color de verde a azul, después de la incubación o si hay crecimiento sobre el medio la prueba se considera positiva. Si no hay cambio de color ni crecimiento la prueba es negativa.



La respuesta de la *Escherichia coli* a la prueba IMVIC es : +,+,-,-

El producto satisface el ensayo de *Escherichia coli* si no se observan colonias en el Agar Mac Conkey o si las reacciones bioquímicas (IMVIC) son diferentes al resultado esperado: I +, M +, V -, C -, . En este caso el producto se acepta. En caso contrario el producto no satisface el ensayo, el producto se rechaza.



EQUIPOS Y CRISTALERIA.

DESCRIPCIÓN	MARCA
Agitador Vortex – Genie.	Scientific Industries k-550G
Autoclave Vertical	Vernitrón Medical 8020
Electric Steroclave	
Incubadora doble	Precisión scintific
Baño María	6 C A Corporation E/C
Contador de colonias	AO Scientific Instruments 3325
Cronómetro manual	
Espátula mango de madera	Fischer brand
Balanza	DHAUS
PH metro Mano plato	CORNING 108 H metrec
Gradillas metálicas	
Cocina	CORNING PC 100
Mechero	FISCHER
Pipeta Serológica	Kimax
Erlenmeyer	Kimax
Platos Petri	Pirex
Tubos de ensayo	Kimax

Materiales:

Descripción

Algodón

Alcohol 70°

Cloro

Detergente

Jabón Líquido

Papel de aluminio

REACTIVOS:



Descripción

Fosfato monobásico de potasio.
Brain Heart infusion
Lactose broth
Selenite cystine broth
Tryptic soy Agar
Cetrimide Agar
EMB Agar
Baird – Parker Agar
SS – Agar
Agar Sabouroud Dextrosa
Telarito de potasio.
Yema de huevo.
Glicerina simple.
Cristal violeta.
Solución de lugol.
Alcohol de 98%.
Safranina.
Alcohol 70°
Cloro 3%

Marca

Fisher Chemalert Guide
Difco
Difco™
Difco
Difco™
Merck
Merck
Merck
Difco
BBL



RESULTADOS

Cuadro N° 1

Muestra	Bacterias aerobias mesófilas	Recuento de hongos y levaduras.	Caldo lactosado	Caldo BHI	Caldo selenito cisteína
Apazote – Life.	0 ufc/ml	0 ufc/ml	(-)	(-)	(-)
ANÁLISIS □aciones	< 100 ufc/g ó ml de muestra.	< 10 ufc/g ó ml	Ausencia de <i>E. coli</i> .	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	Ausencia de Salmonella.

Cuadro N° 2

Muestra	Bacterias aerobias mesófilas	Recuento de hongos y levaduras.	Caldo lactosado	Caldo BHI	Caldo selenito cisteína
Tintura de Orégano.	2 ufc/ml.	0 ufc/ml.	(-)	(-)	(-)
ANÁLISIS □aciones	< 100 ufc/g ó ml de muestra	< 10 ufc/g ó ml.	Ausencia de <i>E. Coli</i> y Enterobacterias.	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	Ausencia de Salmonella.

Cuadro N° 3

Muestra	Bacterias aerobias mesófilas	Recuento de hongos y levaduras.	Caldo lactosado	Caldo BHI	Caldo selenito cisteína
Ovaril	0 ufc/ml.	0 ufc/ml.	(-)	(+)	(-)
ANÁLISIS □aciones	< 100 ufc/g ó ml de muestra	< 10 ufc/g ó ml.	Ausencia de <i>E. coli</i> y Enterobacterias	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	Ausencia de Salmonella.



Cuadro N° 4

Muestra	Bacterias aerobias mesófilas	Recuento de hongos y levaduras.	Caldo lactosado	Caldo BHI	Caldo selenito cisteína
Extracto de Sen de Alejandría	> 300 ufc/ml.	0 ufc/ml.	(-)	(-)	(-)
ANÁLISIS □aciones.	<100 ufc/g ó ml de muestra	<10 ufc/g ó ml.	Ausencia de <i>E. coli</i> y Enterobacterias.	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	Ausencia de Salmonella.

Cuadro N° 5

Muestra	Bacterias aerobias mesófilas	Recuento de hongos y levaduras.	Caldo lactosado	Caldo BHI	Caldo selenito cisteína
Jengibre.	7 ufc/ml.	0 ufc/ml.	(-)	(+)	(-)
ANÁLISIS □aciones.	<100 ufc/g ó ml de muestra	<10 ufc/g ó ml.	Ausencia de <i>E. coli</i> y Enterobacterias.	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	Ausencia de Salmonella.

Cuadro N° 6

Muestra	Bacterias aerobias mesófilas	Recuento de hongos y levaduras.	Caldo lactosado	Caldo BHI	Caldo selenito cisteína
Carao – Life	2 ufc/ml.	0 ufc/ml.	(-)	(-)	(-)
ANÁLISIS □aciones.	<100 ufc/g ó ml de muestra	<10 ufc/g ó ml.	Ausencia de <i>E. coli</i> y Enterobacterias.	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	Ausencia de Salmonella.



Cuadro N°7

Muestra	Bacterias aerobias mesófilas	Recuento de hongos y levaduras.	Caldo lactosado	Caldo BHI	Caldo selenito cisteína
Guayaba.	9 ufc/ml.	0 ufc/ml.	(-)	(-)	(-)
ANÁLISIS □aciones.	<100 ufc/g ó ml de muestra	<10 ufc/g ó ml.	Ausencia de <i>E. coli</i> y Enterobacterias.	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	Ausencia de Salmonella.

Cuadro N°8

Muestra	Bacterias aerobias mesófilas	Recuento de hongos y levaduras.	Caldo lactosado	Caldo BHI	Caldo selenito cisteína
Fat – Reductor	0 ufc/ml.	0 ufc/ml.	(-)	(-)	(-)
ANÁLISIS □aciones.	<100 ufc/g ó ml de muestra	<10 ufc/g ó ml.	Ausencia de <i>E. coli</i> y Enterobacterias.	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	Ausencia de Salmonella.



ANÁLISIS DE RESULTADOS

Una vez realizado los correspondientes análisis y después de obtener los resultados podemos expresar lo siguiente:

- 1- Los cuadros N_o 1,2,5,6,7 y 8, nos presenta los resultados obtenidos del análisis microbiológico aplicado a las muestras de: Jarabe Apazote-life, Tintura de Orégano, Jarabe de Jengibre, Jarabe Carao-life, Jarabe de Guayaba y Fat-Reductor respectivamente encontramos que en el conteo total de Bacterias Aerobias Mesófilas , Recuentos de Hongos Filamentosos y Levadura e Identificación de microorganismos patógenos, los productos cumplen con las especificaciones descritas en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos; por lo que estos se aceptan y pueden ser comercializado para consumo humano.
- 2- El cuadro N_o 3 nos refleja el análisis microbiológico realizado a la muestra de tintura de Ovaril el cual a pesar de que se encontró la presencia de *Staphilococcus epidermidis* el producto cumple con las especificaciones de la Farmacopea de referencia ya que este microorganismo no se tomará en cuenta en este tipo de análisis por no encontrarse dentro de los microorganismos patógenos por tanto el producto se acepta.
- 3- En el cuadro N_o 4 se encuentran los resultados obtenidos del análisis microbiológico aplicado al Extracto de Sen de Alejandría el cual no cumplió con las especificaciones establecidas por dicha Farmacopea debido a la presencia de numero de microorganismos > 300 UFC/ml razón por la cual este producto se rechaza.



CONCLUSION

Después de haber realizado un exhaustivo control microbiológico a una muestra de Fitofármacos de uso tanto interno como externo elaborados por el Laboratorio Ecolife concluimos que :

- 1- De los fármacos analizados siete de estos cumplen con las especificaciones establecidas para fitofarmacos en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, siendo el extracto de Sen de Alejandría el producto que no cumplió con estas especificaciones, ya que se encontró por encima de los valores establecidos en cuanto al recuento de Bacterias Aerobias Mesofilas.
- 2- Los productos manufacturados por este laboratorio son seguros ya que solamente uno de los ocho que se analizaron no cumplió con los parámetros establecidos.
- 3- Es de vital importancia cumplir en su totalidad con los parámetros de control que se realizan desde el momento del cultivo de la planta hasta su procesamiento en la Industria Farmacéutica.



RECOMENDACIONES

- Es necesario realizar una revisión estricta desde el punto de vista microbiológico a cerca del cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufacturas(BPM) a lo largo de todo el proceso de elaboración de los productos así como del personal que participa en este.
- Se debe tener presente que todo Fitofármaco debe ser considerado como un medicamento al que hay que exigirle el cumplimiento de los parámetros propios de los mismos como son: Calidad, Seguridad y Eficacia.
- Si una vez realizado los controles de calidad a los productos en estudio estos no cumplen con las especificaciones , no deben ser comercializados y deben ser rechazados de inmediato.
- Es de importancia contar con un ente regulador en la fabricación de productos a base de plantas medicinales que asegure su calidad y que como tal no pongan en riesgo la salud de la población.



BIBLIOGRAFIA

- 1 WHO(OMS), Quality Control Methods .Geneva,1998 pág 74.
- 2 Rev Cubana PLANT MED 2001. (2), 73.
Lic. Rosa Menéndez Castillo
Investigadora Auxiliar
Jefa del Departamento de productos Naturales.
- 3 Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
Pág.54-58
- 4 [http: // www-iespana, eo/natureduca/med – usos secado. htm](http://www.iespana.es/natureduca/med-usos-secado.htm) # principio # principio.
- 5 [www.Sld.cu / revista, pla / Vol. 6 01 /pla 08201 . htm.](http://www.Sld.cu/revista/pla/Vol.601/pla08201.htm)
- 6 Morales Miguel, La Revolución de los Fitofármacos
<http://www.todito.com/páginas/noticias/80029.html>.
- 7 [http: // www. Medic.es/ sld./. htm.](http://www.Medic.es/sld/)
- 8 Muñoz Rodríguez Nury de Jesús.
Estudio de Estabilidad de Fitofármacos elaborados en la Fundación Centro Nacional de la Medicina Popular Tradicional, Estelí, Nicaragua (Junio – Diciembre 1996)
- 9 GAEDCKE Y STEINHOFF Herbal Medicinal productos. Año 2003



- 10 Flobisher. Martín, et. Al. Microbiología 5ta. Edición, 1978.
SALVAT EDITORES S.A. Pág. 474,507,509,560,563,510,512.
- 11 Collins. CH, Patricia ,Lien, Métodos Microbiológicos Editorial
Ucribia S.A., pág: 313, 336,347.
- 12 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Sexta edición
Pág.1733 –1740.
- 13 Microbial Limit. Test. USP 24. Pág 1814 – 1818.



ANEXO 1

Resultado de las cantidades de producto.						Número probable de bacterias por gramo de producto.
1.2 g	0.1g	0.01 g	0.001 g	0.0001 g	0.00001 g	
10	10	10	10	10	10	
-	-	-	-	-	-	<1
+	-	-	-	-	-	<10>1
+	+	-	-	-	-	<100>10
+	+	+	-	-	-	<1,000>100
+	+	+	+	-	-	<10,000>10,000
+	+	+	+	+	-	<100,000>10,000
+	+	+	+	+	+	>100,000

ANEXO 2

Propiedades Distintivas de los Coliformes y Organismos Asociados.

Especies	Lactosa	Glucosa	Sacarosa	I	M	V	C	Gelatina	Motilidad
<i>Escherichia Coli</i>	⊕	⊕	⊕	+	+	-	-	-	+
<i>Citrobacter Freundii</i>	⊕	⊕	⊕	-	+	-	+	-	+
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	⊕	⊕	⊕	-	-	+	+	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	⊕	⊕	⊕	-	-	+	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	-	⊕	⊕	+	-	-	+	+	+
<i>Grupo providencia</i>	-	⊕	⊕	+	+	-	+	-	+
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-		+	+

+ = prueba positiva

- = prueba negativa

⊕ = formación de ácido y gas.

I: Prueba de ondol.

M: Prueba del rojo de metilo.

V: Prueba de vogues proskauer.

C: Prueba del citrato.



ANEXO 3

Propiedades diferenciales para *Pseudomonas* spp.

Especies	Pigmento Fluorescente	Prueba HL	Hidrólisis Arginina	Licuación gelatina	Crecimiento	
					4 °C	42 °C
<i>P.aeruginosa</i>	+	Ox	+	+	-	+
<i>P. fluorescens</i>	+	Ox	+	+	+	-
<i>P. putida</i>	+	Ox	+	-	v	-
<i>P. alkaligenes</i>	-	Alk	-	-	-	+
<i>P. pseudo- alkaligenes</i>	-	Alk	+	-	-	v
<i>P. maltophilia</i>	-	Alk	-	+	-	-
<i>P. maltophilia</i>	-	Ox	-	+	-	v
<i>P. cepacia</i>	-	Ox	+	v	-	-
<i>P. mallei</i>	-	Ox	+	+	-	+
<i>P. pseudomallei</i>	-	Ox	v	-	v	v
<i>P. stutzeri</i>						

ANEXO 4

Propiedades diferenciales de algunas salmonellas:

Especies	Xilosa	Trehalosa	Arabinosa	H ₂ S	Agar Citrato	Gas en Dextrosa
<i>S. Typhi</i>	v	+	-	+	-	-
<i>S. Paratyphi-A</i>	-	⊕	⊕	-	-	+
<i>S. schottmuelleri</i> (<i>S. paratyphi-B</i>)	⊕	⊕	⊕	+	+	+
<i>S. hirschfeldii</i> (<i>S. paratyphi-C</i>)	⊕	⊕	⊕	+	+	+
<i>S. enteritidis</i>	⊕	⊕	⊕	+	+	+
<i>S. typhi-murium</i>	⊕	⊕	⊕	+	+	+
<i>S. cholerae-suis</i>	⊕	-	-	-	+	+

- + : Prueba positiva.
- : Prueba negativa.
- ⊕ : Formación de ácido y gas.

ANEXO 5

Características diferenciales para *E. Coli*.

	Gas a 44°C	Indol	RM	VP	Citrato	Licuaación gelatina	Motilidad	KCN	Ureasa	Malonato	Gluconato	H ₂ S	Lisina descarboxilasa
<i>E. coli</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

ANEXO 6

Características diferenciales de las especies De *Staphylococcus*.

Características	<i>aureus</i>	<i>epidermidis</i>
Coagulasa Manitol	+	-
Ácido aerobiamente	+	d
Ácido anaerobiamente	+	-
Toxina	+	-
Endonucleasas	+	-
termoresistentes	-	+
Biotina para el crecimiento de la pared celular	+	-
Ácido ribitolteicoico	-	+
Ácido glicerolteicoico	+	-
Proteína A		

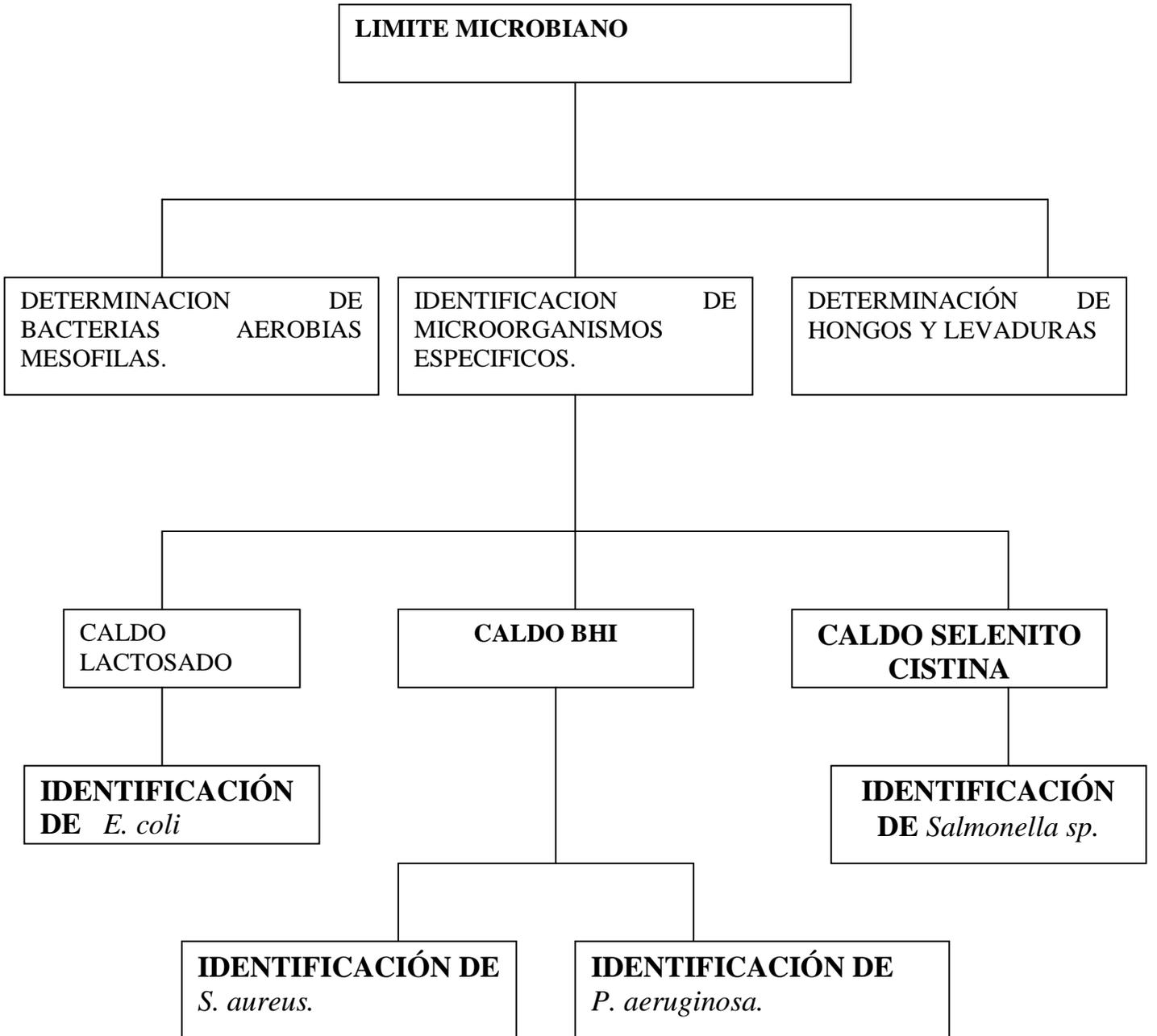
+: Mayoría de cepas positivas.

- : Mayoría de cepas negativas.

d : Algunas cepas positivas, algunas cepas negativas.

ANEXO 7

LIMITE MICROBIANO



ANEXO 8

