

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS FITOTERÁPICOS



Armando Cáceres

Universidad de San Carlos de Guatemala y
Laboratorio de Productos Naturales Farmaya, Guatemala.
E-mail: acaceres@farmaya.net



**II Congreso Centroamericano de Productos
Naturales Medicinales**

Comayagua, 23 de junio de 2017

Factores determinantes de la calidad en la producción de plantas medicinales

Variable	Ejemplos de agentes
■ Genotipo	Especies, cultivar
■ Desarrollo	Crecimiento, floración
■ Morfogénesis	Órgano, tejido
■ Ambiente	Fertilidad del suelo, luz, temperatura, competencia
■ Proceso	Secado, destilado, extracción
■ Contaminación	Física, biológica, química

DESHIDRATADO VEGETAL

Parámetros a controlar

- ✓ **Temperatura del aire de secado.**
- ✓ **Velocidad del aire de secado.**
- ✓ **Altura de la capa del producto.**
- ✓ **Tamaño del producto.**
- ✓ **Humedad dentro y fuera del sistema.**
- ✓ **Temperatura del producto.**
- ✓ **Intensidad de luz que entra al sistema.**
- ✓ **Contaminación microbiana.**

Procesamiento poscosecha y pérdida de metabolitos secundarios

Los procesamientos poscosecha tienen por objeto la conservación de las características físicas, químicas, organolépticas, farmacológicas y sanitarias de la droga vegetal. Los factores que inciden en la pérdida son:

- ▣ Degradación por procesos metabólicos
- ▣ Hidrólisis de principios activos
- ▣ Descomposición por la luz y por enzimas
- ▣ Degradación de sustancias termolábiles por calor
- ▣ Volatilización de los aceites esenciales
- ▣ Contaminación por hongos y bacterias

ECOLOGIA MICROBIANA

Efecto en la industria farmacéutica

◆ **Atmósfera**

- ✓ Recuentos microbianos
- ✓ Reducción del recuento
- ✓ Desinfección química
- ✓ Irradiación UV
- ✓ Aire comprimido
- ◆ **Agua**
- ✓ Fuentes de agua
- ✓ Calidad del agua usada
- ✓ Desagues y aguas negras
- ✓ Ablandamiento de agua
- ✓ Sistema de distribución
- ✓ Almacenaje de agua

◆ **Flora respiratoria/dérmica**

- ✓ Transferencia de personal
- ✓ Diseño de áreas
- ◆ **Materias primas**
- ◆ **Empacado**
- ◆ **Edificios**
- ✓ Paredes y cielos
- ◆ **Equipos**
- ✓ Material de colecta
- ✓ Lavado y desinfección
- ✓ Chequeo microbiano
- ◆ **Equipos de limpieza**

DROGA VEGETAL

Características de la materia prima

- Completamente seca (<10% humedad)
- Con su color natural
- Con su olor característico
- Libre de material indeseable
 - Otros órganos de la planta
 - Otros materiales y contaminantes
- Tamaño lo más entero posible (2-6 cm)
- Libre de contaminación fecal
 - Coliformes totales 10^4 NMP/g
 - Coliformes fecales 10^1 (sin *Salmonella*)
 - Bacterias aeróbicas 10^5
 - Mohos y levaduras 10^5

CALIDAD MICROBIOLÓGICA

Riesgos de contaminación durante el proceso

Etapa	Nivel de riesgo
Precultivo	Ninguno a bajo
Cultivo en el campo	Alto
Cosecha	Alto
Almacenaje intermedio	Bajo a mediano
Transporte	Ninguno a bajo
Tratamientos	Bajo a mediano
Producto final	Generalmente ninguno

Kneifel W et al. *Planta Med.* 2002; 68:5-15.

CALIDAD MICROBIOLÓGICA

Factores determinantes

Intrínsecos

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

Extrínsecos

- ✓ Clima
- ✓ Humedad
- ✓ Ubicación/Posición
- ✓ Método de cosecha
- ✓ Postcosecha
- ✓ Estado físico
- ✓ Tratamiento tecnológico
- ✓ Empaque/almacenaje
- ✓ Contaminación bacteriana exógena

VALIDACION DE METODOLOGIA

Cepas y medios selectivos recomendados

Para validar el método, cultive las cepas de referencia en los medios de cultivo sugeridos a 30-35°C durante 18-24 h (*Candida* spp. 20-25°C por 48 h), diluya en solución salina amortiguada a una suspensión de 10³ microorganismos/ml.

Microorganismos	Cepa	Medio
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Soya-Caseina
<i>Candida albicans</i>	ATCC 2091	Caldo Sabouraud
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Caldo lactosado
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	Soya-Caseina
<i>Salmonella abony</i>	NCTC 6017	Caldo lactosado
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Soya-Caseina

WHO, 2011. *Quality Control Methods*, pp. 75-83.

Cuantificación de microorganismos

TECNICA

Recuento en lámina
Recuento en cámara
Citometría de flujo
Número más probable (NMP)
Siembra cuantitativa
Filtración por membrana
Fluorimetría
Fluorocult/cromocult

CARACTERISTICAS

bacterias, hongos
esporas, protozoos
equipo sofisticado
determinación en tubo
en tubo o en placa
proceso en serie
equipo sofisticado
rapidez, alto costo

TUBOS MULTIPLES

Equipo y materiales

Equipos y materiales

- ✓ Incubadora a 35°C
- ✓ Incubadora a 44°C
- ✓ Campana bacteriológica
- ✓ Mechero
- ✓ Autoclave
- ✓ Gradillas
- ✓ Asas bacteriológicas
- ✓ Campanas de Durham

Fungibles

- ✓ Pipetas estériles de 1 ml en 0.1 ml
- ✓ Agua peptonada 0.1% en frascos de 9 a 90 ml
- ✓ Tubos con 9 ml de caldos: Lactosado, Caldo Bilis Verde Brillante (BVB) y EC
- ✓ Agar MacConkey

TUBOS MÚLTIPLES DE FERMENTACIÓN

Fundamentos y Prueba Presuntiva

Fundamento: Se observa la producción de gas por fermentación de lactosa por bacterias viables y la estimación de la densidad de coliformes por el NMP.

Procedimiento: Homogenizar y diluir el material (1:10)

Prueba presuntiva:

- ✓ Inocular una serie de tubos con caldo lactosado, con cantidades decimales (1 ml, 0.1 ml, 0.01 ml).
- ✓ Incubar a 35°C durante 24 h.
- ✓ Examinar la presencia o ausencia de gas.
- ✓ Reincubar si no hay gas y examinar a las 48 h.
- ✓ **Presencia de gas = Prueba Presuntiva Positiva**
- ✓ **Ausencia de gas = Prueba Presuntiva Negativa**

TUBOS MULTIPLES DE FERMENTACIÓN

Pruebas Confirmativa y Complementaria

Prueba confirmativa

- Sembrar una asada de los tubos + en la prueba presuntiva en
- ✓ tubos con caldo BVB e incubar a 35°C por 24 h para CT.
- ✓ tubos con caldo BVB o EC e incubar a 44°C por 24 h para CF.

Interpretación: La presencia de gas se interpreta como prueba confirmativa positiva.

Prueba complementaria

- Estriar una asada del 10% de tubos positivos en agar Mac Conkey e identificar.

Interpretación: La combinación de tubos positivos se busca en la tabla para obtener el NMP/100 ml de muestra analizada.

RECUENTO MICROBIANO

Cálculo del número más probable (NMP)

0.1 ml/ tubo	0.01 ml/ tubo	0.001 ml/tubo	NMP/g o ml
3*	3	3	>1,100
3	3	2	1,100
3	3	1	500
3	3	0	200
3	2	3	290
3	2	2	210
3	2	1	150
3	2	0	90

0.1 ml/ tubo	0.01 ml/ tubo	0.001 ml/tubo	NMP/g o ml
3	1	3	160
3	1	2	120
3	1	1	70
3	1	0	40
3	0	3	95
3	0	2	60
3	0	1	40
3	0	0	23

* Número de tubos con crecimiento microbiano; los caldos pueden variar de acuerdo con el microorganismo cuyo crecimiento queremos cuantificar.

FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Materiales necesarios

Equipo y materiales

- ✓ Incubadora a 35°C
- ✓ Contador de colonias
- ✓ Campana bacteriológica
- ✓ Filtro para membrana (acero o vidrio)
- ✓ Bomba de vacío
- ✓ Mechero
- ✓ Pinzas planas

Materiales/reactivos

- ✓ Membrana de $<0.45 \mu\text{m}$ de nitrato o acetato de celulosa
- ✓ Cajas de petri estériles
- ✓ Agar Plate Count o Agar Caseína-Soya
- ✓ Agar Endo C

FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Principio y procedimiento

Principio. Estima el número de bacterias viables en muestras líquidas de baja turbidez. Se basa en la suposición que los bacterias forman colonias separadas en membranas colocadas sobre medios de cultivo que pueden ser:

PCA: Para recuentos totales de bacterias.

Endo: Para recuento de coliformes totales y fecales.

Saboraud: Para recuento de hongos.

Procedimiento

- ✓ Esterilizar el aparato de filtración flameando el interior.
- ✓ Dejar que se enfríe el aparato y colocar la membrana (0.45μ).
- ✓ Agregar el material de la muestra y filtrar.
- ✓ Colocar la membrana con la parte inferior hacia abajo sobre la superficie del Agar PCA, Endo o Sabouraud en cajas de Petri.
- ✓ Incubar a 35°C por 24 h.

FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Cálculo del recuento de enterobacterias

1.0g o ml	0.1g o ml	0.01g o ml	Número más probable por gramo (NMP/g)
+	+	+	$> 10^2$
+	+	-	$< 10^2$ pero más de 10
+	-	-	< 10 pero más de 1
-	-	-	Menos de 1

WHO. *Quality Control Methods*, p. 79. Geneva, 2011.

PRUEBA DE PUREZA

Confirmación Coliformes

- **Cuantificación.** Inocular en caldo Mossel material homogenizado, diluir (1, 0.1 y 0.01 g/ml), sembrar en Agar bilis violeta con glucosa/lactosa. Incubar a 35°C por 18-24 h. Contar colonias bien desarrolladas color rojizo (Gram-).
- ***E. coli.*** Transferir a 100 ml de caldo MacConkey (MC), incubar a 44°C por 24 h, subcultivar a placas de Agar MC y reincubar. Estimar colonias rojas, no mucoides, rodeada de zona rojiza. Confirmar por formación de indol.
- ***Salmonella.*** Transferir 10 ml a 100 ml de caldo tetrionato-BVB, incubar a 42°C por 18-24 h. Subcultivar en Agar: desoxicolato citrato, xilosa, lisina o VB. Incubar a 36°C por 24 h.
- **Confirmación.** Subcultivar colonias en TSI en siembra profunda. Es positiva si presenta cambio de color en profundidad con formación de gas y H₂S. Confirmar por BQ o serología.

PRUEBA DE PUREZA

Pseudomonas y Staphylococcus

- Pretratar material en amortiguador peptonado.
- ▲ *Pseudomonas aeruginosa*
 - Inocular 100 ml de Medio Soya-Caseina
 - Incubar a 35°C por 24-48 h.
 - Subcultivar en Agar Ceftrimida e incubar.
 - Si no hay crecimiento la prueba es negativa.
- ▲ *Staphylococcus aureus*
 - Inocular Agar Blair-Parker
 - Incubar a 35°C, por 24-48 h.
 - Si no hay crecimiento la prueba es negativa.

PRUEBA DE PUREZA

Recuento aeróbico en placa

- Pretratar el material con amortiguador y diluir.
- **Filtración:** Esterilizar el equipo y filtro $<0.45 \mu\text{m}$, transferir 10 ml de la dilución y filtrar; lavar cada membrana y colocar una en agar caseína-soya (ACS) y otra en agar Sabouraud (AS). Incubar 5 días a $30-35^{\circ}\text{C}$ y a $20-25^{\circ}\text{C}$.
- **Recuento en placa (bacterias):** En placas de Petri agregar 1 ml de material pretratado a 15 ml de ACS líquido o repartirlo en superficie. Incubar a $30-35^{\circ}\text{C}$ por 5 días.
- **Recuento en placa (hongos):** En placas de Petri agregar 1 ml de material pretratado a 15 ml de AS o repartirlo en superficie. Incubar a $20-25^{\circ}\text{C}$ por 5 días
- Contar y calcular el número de colonias.

FLUOROCULT/CROMOCULT

Equipo y materiales

- ✓ Mechero → Gas propano
- ✓ Campana bacteriológica → LUV
- ✓ Pipetas estériles de 1 ml en 0.1 ml → Autoclave
- ✓ Agua peptonada 0.1% en recipientes de 9 a 90 ml

Caldo Fluorocult

- Tubos con 9 ml de Caldo Fluorocult

Agar Cromocultu

- Cajas de petri estériles
- Agar para Coliformes

- ✓ Incubadora a 35°C
- ✓ Reactivo de Kovacs

AGAR CROMOCULT

Fundamento, Procedimiento e Interpretación

- La interacción de peptonas-piruvato-sorbitol garantizan el crecimiento de colonias, incluso coliformes dañados subletalmente. El crecimiento de bacterias G+ y G- es inhibido por T-7 que no afecta el crecimiento de coliformes
- La combinación de dos sustratos cromogénicos en un agar selectivo permite la detección simultánea de CT y *E. coli*.

Procedimiento

- Inocular por vertido en placa o por esparcido en superficie de la placa. Puede usarse la filtración por membrana.
- Incubar a 35-37°C por 24 h.

Interpretación

- ✓ *E. coli*: colonias azul oscuro a violetas.
- ✓ CT: colonias salmón a rojas o azul oscuro a violetas.

MONOTUBO PARA COLIFORMES

Caldo Fluorocult LMX

- Combina dos técnicas, solo requiere un medio de cultivo.
- Detecta *E. coli* y coliformes; usa cromógeno XGal y fluorógeno MUG. El medio contiene una enzima que detecta β -D-galactosidasa (BGal) y β -D-glucoronidasa (GUD).
- Cuando BGal rompe XGal, el caldo se torna verde azulado por conversión de agliconas liberadas a índigo. En presencia de GUD la 4 metilumberilferona se rompe del MUG. El caldo fluoresce con UV (365 nm), indicando la presencia de *E. coli*.
- Confirmar la producción de indol por el reactivo de Kovacs, un anillo rojo en la superficie indica la prueba positiva.

Interpretación

- ✓ **Negativo:** No existe cambio de color en el tubo de ensayo
- ✓ **Positivo:** Viraje de amarillo a verde-azulado confirma la presencia de CT, según tabla de NMP.

LIMITES MICROBIANOS

Contaminación máxima aceptada

- Material vegetal “crudo” colectado en condiciones higiénicas que tendrá un procesamiento posterior (físico o químico):
 - *Escherichia coli*, 10^4 /g
 - Propágulos de mohos, 10^5 /g
- Materiales que han sido pretratados o para uso tópico:
 - Bacterias aeróbicas, 10^7 /g
 - Levaduras y mohos, 10^4 /g
 - *Escherichia coli*, 10^2 /g
 - Otras enterobacterias, 10^1 /g
 - ✓ *Salmonella*, ninguna
- Otros materiales para uso interno:
 - Bacterias aeróbicas, 10^5 /g
 - Levaduras y mohos, 10^3 /g
 - *E. coli*, 10^1 /g
 - Enterobacterias, 10^3 /g
 - *Salmonella*, ausente

WHO. *Quality Control Methods*, pp. 71. Geneva, 1998.

CALIDAD MICROBIOLÓGICA

de las preparaciones fitofarmacéuticas

- **Categoría 1.** Preparaciones que requieren esterilidad
 - Prueba de esterilidad
- **Categoría 2.** Preparaciones para uso tópico y transdérmico
 - Bacterias aeróbicas, $10^2/g$
 - *Pseudomonas*, ausente
 - Enterobacterias, $10^1/g$
 - *Staphylococcus*, ausente
- **Categoría 3A.** Preparaciones para uso oral/rectal
 - Bacterias aeróbicas, $10^2/g$
 - Enterobacterias, $10^1/g$
- **Categoría 3B.** Preparaciones para administración oral sin tratamiento.
 - Bacterias aeróbicas, $10^4/g$
 - *E. coli*, *Salmonella* y *Staphylococcus*, ausentes
 - Enterobacterias, $10^2/g$
- **Categoría 4A.** Preparaciones a las que se agregará agua hirviendo.
 - Bacterias aeróbicas, $10^7/g$
 - *E. coli*, $10^2/g$
- **Categoría 4B.** Preparaciones a las que no se agregará agua hirviendo.
 - Bacterias aeróbicas, $10^5/g$
 - *E. coli*, *Salmonella* y *Staphylococcus*, ausentes
 - Enterobacterias, $10^3/g$

CONTROL MICROBIOLÓGICO

Valor indicativo de grupos de MOs

Grupo	Significado
Recuento total mesofílico	Parámetro general de higiene
Enterobacterias	Indica contaminación fecal
Coliformes/Enterococos	Indica contaminación fecal
Pseudo- y aeromonadas	Presagia descomposición
Estafilococos coagulasa +	Patógeno de origen humano
Bacterias esporoformadoras	Microflora del suelo
Lactobacilos	Indica plantas descompuestas
Levaduras y mohos	Micotoxigenicidad potencial
Microorganismos patógenos	Alto riesgo

CONTROL MATERIA VEGETAL

Microbiológico-Sanitario

Materia vegetal

- Recuento aeróbico en placa
- Mohos y levaduras
- Coliformes (totales y fecales)

Líquidos

- Recuento en placa
- Mohos y levaduras
- Coliformes (totales y fecales)

Semisólidos

- ✓ Recuento en placa
- ✓ Mohos y levaduras
- ✓ Coliformes (totales, fecales, sin *E. coli* ni *Salmonella*)

CONTROL DE ACTIVIDAD

Bioensayos farmacológicos

- **Problemas de los ensayos químicos**
 - Desconocimiento de los constituyentes activos
 - Correlación con la actividad biológica
 - Equipamiento necesario (excesivo uso de HPLC)
- **Bioensayos como estándares**
- **Problemas de los bioensayos como estándares**
 - Falta de reproducibilidad en sistemas automatizados
 - Falta de modelos para ciertas enfermedades
 - Actividad consecuencia de una mezcla de efectos
 - Correlación *in vitro* – *in vivo*
- **Algunos ejemplos de bioensayos como estándares**
 - Actividad antimicrobiana Actividad antiinflamatoria
 - Citototoxicidad Inmunomoduladores Antioxidantes