

Artículo original

# Desarrollo y validación de una metodología para el control de calidad microbiológico de fitofármacos y fitomedicamentos.

Development and validation of methodology for microbiological quality control of phytopharmaceuticals and phytomedicines.

Rojas-Gelves Clody<sup>1\*</sup>, Pérez-Colmenares Alida<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida 5101. Venezuela. <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida 5101. Venezuela.

Recibido: julio de 2022–Aceptado: septiembre de 2022

## RESUMEN

Se desarrolló y validó un método microbiológico para el control de calidad de fitofármacos y fitomedicamentos con el fin de cuantificar bacterias aerobias mesófilas, mohos y levaduras, así como cualificar microorganismos específicos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi*) considerados microbiota objetable dentro de los criterios de aceptación para la calidad microbiológica de formas farmacéuticas no estériles. Se realizaron pruebas preliminares para determinar el límite de detección, repetibilidad, reproducibilidad/eficacia relativa/ recuperación y control ambiental. Así mismo se verificó el método a través de las pruebas de promoción de crecimiento y aptitud del método de recuento, preparación de cepas de prueba, promoción del crecimiento de los medios, controles negativos e indicadores en medios sólidos. Se determinaron los parámetros de validación para la evaluación cuantitativa (especificidad, exactitud, precisión, límite de cuantificación y detección, robustez y tolerancia), al igual que los parámetros de evaluación cualitativa (especificidad, límite de detección, tolerancia y robustez). Los resultados demostraron que el método ensayado es específico,

tiene sensibilidad, tolerancia y robustez constituyendo una alternativa para el análisis microbiológico de fitofármacos y fitomedicamentos.

## PALABRAS CLAVE

Validación, fitofármacos, fitomedicamentos, método microbiológico, control de calidad.

## ABSTRACT

A microbiological method was developed and validated for quality control of phytopharmaceuticals and phytomedicines in order to quantify mesophilic aerobic bacteria, molds and yeasts and qualifying specific microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi*) considered objectionable microbiota within the acceptance criteria for the microbiological quality of non-sterile pharmaceutical forms. Preliminary tests were performed to determine detection limit, repeatability, reproducibility/relative efficiency/recovery, and environmental control. Likewise, the method was verified through the growth promotion and suitability counting method, preparation of test strains, media growth promotion, negative controls and solid media

indicators. The validation parameters for the quantitative evaluation (specificity, accuracy, precision, quantification and detection limit, robustness and tolerance) were determined, as well as the qualitative evaluation parameters (specificity, detection limit, tolerance and robustness). The results showed that tested method is specific, has sensitivity, tolerance and robustness, representing an alternative for the microbiological analysis of phytopharmaceuticals and phytomedicines.

## KEY WORDS

---

Validation, phytomedicines, phytopharmaceuticals, microbiological method, quality control.

## INTRODUCCIÓN

---

Los métodos clásicos o tradicionales utilizados para el control microbiológico de medicamentos fueron desarrollados hace más de un siglo y se continúan utilizando ya que cumplen con su función de enumerar e identificar microorganismos, contribuyendo a controlar la seguridad microbiológica de los productos farmacéuticos [1]. La definición analítica de validación es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y a los atributos de calidad previamente establecidos [2]. Es fundamental el uso de métodos validados en cualquier sistema de calidad. En particular, la validación de los métodos microbiológicos por la propia naturaleza de los organismos vivos, los cuales muestran una considerable capacidad de variaciones genéticas y mutaciones [3].

Los análisis microbiológicos tienen características distintas de los análisis físicos y químicos, con sus intrínsecas fuentes de variabilidad en los resultados, aspectos que traen dificultades en el establecimiento de líneas normativas en los ensayos [4]. En tal sentido, es necesario establecer un protocolo de validación que

permita especificar los requisitos y condiciones que debe cumplir un método microbiológico siguiendo las pautas establecidas en los textos oficiales para productos no estériles, evaluando las pruebas preliminares y verificando el desempeño del método en estudio, para asegurar que no existe algún factor que influya en la detección del organismo de interés [5]. Los parámetros críticos a evaluar son exactitud, precisión, especificidad, límite de detección y cuantificación, linealidad y rango, robustez y equivalencia; su determinación dependerá de la categoría del ensayo: cualitativo/cuantitativo [1].

Se realizó el desarrollo y validación una metodología siguiendo como referencia las pautas del procedimiento de la USP 41 en lo relativo a la evaluación de productos no estériles, ya que no existe un método específico para los ensayos microbiológicos de fitofármacos y fitomedicamentos sino que se indican son procedimientos para suplementos dietéticos, siendo los límites mayores que los permitidos para productos farmacéuticos no estériles. [5].

El término fitofármaco no debe confundirse con el de planta medicinal, al respecto, se ha precisado su significado en los términos siguientes: “Son productos medicinales acabados y etiquetados cuyos ingredientes activos estandarizados, 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”. Mientras que fitomedicamentos entonces son un extractos vegetales estandarizados (fitofármacos), normalizado y estabilizado y del cual se conoce una acción farmacológica definida y cuantificada, fabricado con tecnología farmacéutica moderna y que su utilización terapéutica está basada en resultados obtenidos de estudios clínicos diseñados y desarrollados de acuerdo con criterios internacionales [6].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce que la buena salud es esencial para el desarrollo económico y social sostenido y la reducción de la pobreza. El acceso a servicios básicos de salud es crucial para el mantenimiento y mejoramiento de la salud. Al mismo tiempo, es

preciso evitar que las personas se empobrezcan a causa de sus gastos sanitarios. Los objetivos de la estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023 consisten en: aprovechar la posible contribución de la Medicina Tradicional y Complementaria (MTC) a la salud, el bienestar, la atención de salud centrada en la persona y la cobertura sanitaria universal; así como promover la utilización segura y eficaz de la MTC mediante la reglamentación, investigación e integración de sus productos, prácticas y profesionales en los sistemas de salud, según proceda. La estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023 está concebida para ayudar a los países a determinar la mejor manera de promover la salud y proteger a los usuarios que desean recurrir a esos productos, prácticas y profesionales. [7].

La presente investigación permitió desarrollar y validar una metodología para el control de calidad microbiológico de fitofármacos y fitomedicamentos, en la cual se varió la matriz (medio de cultivo) en referencia a los métodos oficiales para productos no estériles, los resultados obtenidos son fundamentales para gestionar el sistema de calidad correspondiente al análisis de material de origen vegetal (polvos) y diversas formas farmacéuticas (jarabes y cápsulas) de productos naturales, demostrándose que el método es específico, preciso, tiene sensibilidad, tolerancia y robustez.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cepas bacterianas:** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 obtenidas por donación de Laboratorios Farmacéuticos regionales, *Salmonella typhi* CDC 57 CVCM495.

**Medios de cultivo:** Caldo Digerido Caseína y Soja + polisorbato, Caldo Letheen, Agar Letheen, Agar digerido Caseína y Soja + polisorbato, Agar Manitol Salado, Agar Baird Parker, Agar MacConkey, Agar Levine con Eosina-Azul de Metileno, Agar Cetrinida, Agar con Sulfito de Bismuto Los medios de cultivo utilizados son de marcas Merck, HIMEDIA, BD y Sharlau.

**Fitofármacos y fitomedicamentos evaluados:** Alcachofa y Zarparrilla material vegetal polvo.

Alcachofa y Zarparrilla cápsulas. Jarabe a base de *Hedera hélix* (2 marcas comerciales diferentes). Las muestras fueron adquiridas en una farmacia de la región.

**Proceso de validación:** Se realizaron las pruebas preliminares del método, para garantizar la confiabilidad de los resultados y cumplir con los requisitos previos de validación, determinando los siguientes parámetros:

- a) **Límite de detección, Repetibilidad (R):** la determinación se llevó a cabo verificando la medición de la temperatura (30 °C y 37 °C) de dos modelos de incubadoras ubicadas en diferentes laboratorios. Se evaluaron posibles cambios de temperatura antes, durante y después del análisis microbiológico de los fitofármacos y fitomedicamentos evaluados. Esta prueba permitió corroborar el grado de concordancia entre resultados sucesivos e independientes obtenidos por el mismo método empleando un material idéntico bajo las mismas condiciones. De este modo, también se realizó la verificación del desempeño del equipo para su uso previsto.
- b) **Reproducibilidad, Eficacia Relativa (ER)/Recuperación:** se realizó el análisis de pruebas preparatorias con las muestras (material vegetal polvo, producto cápsulas y jarabes) inoculadas con cultivos viables de *Escherichia coli*, ya que, este es el microorganismo considerado objetable en formas farmacéuticas no estériles acuosas o no acuosas vía oral según los criterios de aceptación para preparaciones farmacéuticas establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos 41 (por sus siglas en inglés, USP 41), esta prueba permitió comprobar que el producto evaluado no origina inhibición en el crecimiento del microorganismo [5].
- c) **Sensibilidad Relativa (SR)/Inclusividad:** en esta prueba se observó la capacidad del método para detectar el analito verificando cepas y medios de cultivo, trabajando con las cepas de prueba con un número no mayor a 100 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (U.F.C/mL), por diferentes técnicas de análisis (estría en placa, punción en tubo), se realizaron pruebas de especificidad de cada uno de los microorganismos con el medio de cultivo

selectivo para su crecimiento, pruebas específicas como tinción de Gram y confirmatorias para comprobar la presencia o ausencia, de acuerdo a las características de crecimiento observadas. Los microorganismos, medios selectivos y pruebas confirmatorias fueron los siguientes: *Staphylococcus aureus*: Agar Manitol Salado y Baird Parker, prueba confirmatoria coagulasa, tinción de Gram. *Escherichia coli*: Agar MacConkey prueba confirmatoria Agar Levine con Eosina-Azul de Metileno, tinción de Gram. *Pseudomonas aeruginosa*: Agar Cetrimida, prueba confirmatoria oxidasa y tinción de Gram. *Salmonella typhi*: Agar con Sulfito de Bismuto, prueba confirmatoria de Kligler y tinción de Gram.

- d) Control ambiental: se realizó control ambiental como un parámetro de punto crítico de evaluación durante la ejecución de los análisis microbiológicos y parámetros de validación. Los ambientes evaluados fueron los mesones de trabajo de dos laboratorios usados Salón A2 y preparación de medios del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, respectivamente. El control atmosférico se llevó a cabo por monitoreo pasivo por el método de sedimentación por 1 hora. Luego de la exposición de las placas en el ambiente indicado se realizó la incubación de las mismas de forma invertida a 30 °C por 48 horas. Simultáneamente se hizo toque de dedos por parte del analista, luego de la impronta se procedió a la incubación de las placas de forma invertida a 30 °C por 48 horas. Este control ambiental permitió verificar las condiciones asépticas necesarias para la manipulación de las muestras y el desarrollo del método, así como la limpieza de las áreas de trabajo de los laboratorios.

**Verificación de desempeño del método.** Para verificar el desempeño del método con respecto al recuento microbiano cuali-cuantitativo se realizaron las siguientes pruebas:

- a) Prueba de promoción del crecimiento y aptitud del método de recuento: se realizó la inoculación del producto a evaluar (alcachofa y zarzaparrilla producto cápsulas, alcachofa y

zarzaparrilla material vegetal polvo y jarabes de *Hedera hélix* de dos marcas comerciales diferentes) con concentraciones conocidas de *Escherichia coli* (10-7). Las muestras fueron preparadas en una dilución 1 en 10 (10 mL ó 10 g en 90 mL de diluyente) en Caldo Digerido de Caseína y Soja + polisorbato y en Caldo Lethen (diluyentes) (variable del medio con respecto al establecido en la USP 41). La preparación de las muestras, inoculación y dilución, se llevó a cabo con el fin de determinar la solubilidad y apariencia de las mismas en los medios de cultivo seleccionados y verificar que el producto no tiene propiedades que inhiben el crecimiento del microorganismo inoculado.

- b) Preparación de las cepas: el mantenimiento y conservación de las cepas se efectuó siguiendo el Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) interno del laboratorio sobre el manejo y repique de cepas, se prepararon diluciones de cada uno de los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* (10-7), *Escherichia coli* (10-7), *Pseudomonas aeruginosa* (10-7), *Salmonella typhi* (10-7).
- c) Promoción del crecimiento de los medios: se preparó Caldo Digerido de Caseína y Soja + polisorbato y Caldo Lethen (diluyentes) (variable del medio con respecto al establecido en la USP 41) y se inoculó 1 mL de la dilución de trabajo de los microorganismos: *Staphylococcus aureus* (10-7), *Escherichia coli* (10-7), *Pseudomonas aeruginosa* (10-7), *Salmonella typhi* (10-7). Además se realizó el control negativo del medio de cultivo, agregando 90 mL de cada medio en frascos de vidrio estéril y se incubaron a 30-35 °C por 48 horas. El objetivo de esta prueba fue observar el crecimiento de los diferentes microorganismos evaluados mediante la turbidez de los medios de cultivo inoculados y en el caso de los controles negativos no se debe visualizar crecimiento (turbidez).
- d) Propiedades inhibitorias de los medios: se analizaron los medios de cultivo preparados para verificar que las propiedades son adecuadas, para lo cual se inoculó Agar Cetrimida con el microorganismo de inhibición *Escherichia coli* (10-7) y Agar MacConkey con

*Staphylococcus aureus* (10-7), se incubó a la temperatura especificada de 37 °C durante un tiempo no menor de 48 horas tiempo indicado en la prueba. No se observó crecimiento característico del microorganismo ya que no son los medios selectivos para cada microorganismo seleccionado, para cumplir con el objetivo de la prueba de inhibición.

**Desarrollo del método microbiológico.** El análisis microbiológico de Alcachofa y Zarparrilla material vegetal polvo, Alcachofa y Zarparrilla Cápsulas y Jarabe a base de *Hedera hélix* (2 marcas comerciales diferentes). El proceso de validación se estableció en base al análisis de productos no estériles mediante dos tipos de métodos, uno cuantitativo (determinación de un valor numérico de microorganismos expresados como U.F.C) y otro cualitativo (detección de ausencia o presencia de microorganismos) [8].

**Parámetros validados del método cuantitativo:**

a) **Evaluación del diluyente:** permitió comprobar que los medios utilizados no interfieren en el proceso de recuperación microbiana, se utilizaron dos diluyentes: Caldo Lethen (variable del método, medio diluyente a validar) y el Caldo Digerido de Caseína y Soja + polisorbato (referido por la USP 41). Se realizó el siguiente procedimiento: Se prepararon 5 tubos con 9 mL para cada uno de los diluyentes y se inoculó con 1 mL de la cepa de prueba (*Staphylococcus aureus* 10-7), en su respectiva dilución de trabajo (100 UFC/mL). Luego se colocó por duplicado 1 mL de cada tubo a placas de Petri estériles y luego se incorporaron 15 mL de Agar Digerido Caseína y Soja y Agar Lethen previamente fundido y enfriado a 45 °C aproximadamente, se mezcló la muestra con el agar rotando suavemente la placa. Luego se incubaron las placas a 35 °C por 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de las colonias, para determinar si el recuento obtenido es similar entre ambos y si el diluyente a validar cumple con los parámetros del diluyente estándar. Después del periodo de incubación se llevó a cabo el tratamiento estadístico estableciendo la media, desviación estándar, varianzas

homogéneas, la *t de student* para evaluar pares de resultados.

- b) **Especificidad y Exactitud:** mediante esta prueba la especificidad indica la capacidad para detectar un panel de microorganismos aptos para demostrar que el método funciona para el objetivo propuesto, mientras que la exactitud se refiere a la proximidad de los resultados del método de prueba respecto a los obtenidos por el método oficial. La especificidad y exactitud se establecieron tomando en cuenta el Caldo Lethen (neutralizante Lecitina) + producto Jarabe a base de *Hedera hélix* (2 marcas comerciales diferentes) y Caldo Digerido de Caseína y Soja + polisorbato (neutralizante) + producto Jarabe a base de *Hedera hélix* (2 marcas comerciales diferentes). Se inocularon con 1 mL de la cepas de prueba por separado (*Staphylococcus aureus* 10-7, *Pseudomonas aeruginosa* 10-7, *Escherichia coli* 10-7, *Salmonella typhi* 10-7). Al finalizar la incubación, se contaron las U.F.C. y se determinó la media, desviación estándar y los porcentajes de recuperación bacteriana.
- c) **Precisión:** se refiere al grado de coincidencia entre los resultados de las pruebas individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a muestreos múltiples de suspensiones de microorganismos de laboratorio a lo largo del intervalo de la prueba. La precisión de un método microbiológico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). Se realizó el cálculo de coeficiente de variación, con los datos obtenidos en el parámetro de especificidad y exactitud como son: media, desviación estándar y los cálculos de los porcentajes de recuperación bacteriana.
- d) **Límite de Cuantificación y Detección:** indica el número más bajo de microorganismos que pueden contarse con exactitud, mientras que el límite de detección es el número más bajo de microorganismos en una muestra que puede detectarse bajo las condiciones experimentales establecidas [5]. Estos parámetros están implícitos en la verificación de desempeño del método, a través de la preparación de cepas y pruebas de promoción de crecimiento. Para la

determinación se preparó la dilución mínima de cada cepa de prueba que permite inocular aproximadamente 5 UFC/mL. Se prepararon 3 tubos conteniendo 9 mL de medio (Caldo Lethen) + producto (alcachofa y zarzaparrilla cápsulas) y 3 tubos conteniendo 9 mL de medio para cada microorganismo de prueba, se inoculó 0,5 mL de una dilución posterior a la dilución de trabajo, luego se colocó 1 mL de cada tubo por duplicado en placas de Petri estériles y se añadió 15 mL del medio de cultivo Agar Digerido de Caseína y Soja + polisorbato y se incubó a 35 °C por 48 horas.

- e) **Tolerancia:** es el grado de precisión de los resultados de la prueba obtenidos mediante el análisis de las mismas muestras bajo diversas condiciones, tales como el empleo de analistas, instrumentos, lotes de reactivos y laboratorios diferentes [5]. La tolerancia se evaluó observando la variación de crecimiento en los dos medios de cultivo evaluados (Agar Digerido Caseína y Soja + neutralizantes y en el Agar Lethen), para la determinación (cuantificación) de Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM) y porcentaje de recuperación.
- f) **Robustez:** es la medida de la capacidad del método para no ser afectado por variaciones pequeñas, representa un indicador de la confiabilidad [5]. La robustez fue determinada usando un inóculo de cada una de las cepas de prueba, en el Agar Digerido Caseína y Soja + neutralizantes y en el Agar Lethen (variable del método, medio diluyente a validar).

#### **Parámetros validados del método cualitativo:**

- a) **Especificidad:** se estableció mediante el crecimiento característico positivo en el agar específico cuando se inoculó la cepa correspondiente y negativo cuando se inoculó en el mismo agar, la cepa no específica. Por ejemplo el crecimiento de *Escherichia coli* positivo en el Agar MacConkey y negativo cuando se inocular en Agar Manitol Salado.
- b) **Límite de Detección:** se evaluó realizando una siembra de *Escherichia coli* en el Agar MacConkey y de *Salmonella typhi* en el medio selectivo Agar con Sulfito de Bismuto.
- c) **Tolerancia:** se determinó este parámetro utilizando 2 lotes y marcas comerciales

distintos de Agar MacConkey durante el aislamiento e identificación de la cepa de *Escherichia coli*, sin realizar pre enriquecimiento en Caldo MacConkey.

- d) **Robustez:** se realizaron análisis en diferentes días consecutivos de trabajo y variables ambientales en diferentes áreas de trabajo.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Método cuantitativo:**

- a) **Evaluación del diluyente:** finalizado el tiempo de incubación se realizó el conteo de las U.F.C y los cálculos estadísticos de media, varianza y desviación estándar del conteo obtenido con cada uno de los medios utilizados, en base al tamaño de la muestra. Con los resultados obtenidos se realizó el cálculo del Test de F para comparar las varianzas y determinar si son o no homogéneas, el valor de F experimental se obtiene con los datos obtenidos de los cálculos realizados y se compara con el valor de F de tablas [9], que es una tabla estadística que relaciona el número de muestras a validar entre el número de muestras estándar, si el resultado de F experimental es menor que F tablas se acepta la hipótesis de que las varianzas son homogéneas. Al ser las varianzas homogéneas, se realizó el cálculo de la desviación estándar combinada y *t-student*. [9]. Los cálculos estadísticos obtenidos del valor de *t* experimental (1,7889) comparándolo con el valor de las tablas  $t=0,0025$ , 18 (2,1009) siendo la *t* experimental menor que el *t* de tablas, expresa que no existe diferencia significativa en cuanto a la recuperación del microorganismo con respecto al diluyente estándar. Por lo tanto el uso del diluyente (Caldo Lethen) no afectó la recuperación de microorganismos.
- b) **Especificidad, exactitud y porcentaje de recuperación:** transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de las colonias de cada uno de los jarabes evaluados y los cálculos de los porcentajes de recuperación (%R) obteniendo una media para el Caldo Digerido Caseína de Soja + polisorbato + productos (Jarabe a base de *Hedera hélix*) + inóculo %R:

93,20% (*S. typhi*), 95,55% (*E. coli*), 97,14% (*P. aeruginosa*) y 97,79% (*S. aureus*). Mientras que para el medio Caldo Lethen (neutralizante Lecitina) + productos (Jarabe a base de *Hedera hélix*) + inóculo fueron 94,56 % (*S. typhi*), 96,70% (*E. coli*), 95,75% (*P. aeruginosa*) y 93,65% (*S. aureus*). Se comprobó de este modo que los neutralizantes, al interaccionar con el producto eliminan la acción del conservador del jarabe, por lo tanto no tienen influencia en la recuperación microbiana, ya que en los resultados obtenidos se mantuvieron sobre los límites establecidos (mayor al 70 %) [5].

- c) **Precisión:** se calculó el porcentaje de Coeficiente de Variación (%CV) relacionado con los porcentajes de recuperación y medias de los valores obtenidos en la prueba de especificidad y exactitud, obteniendo los siguientes resultados en Caldo Digerido Caseína de Soja + polisorbato + productos (Jarabe a base de *Hedera hélix*) + inóculo: 1,38% (*S. typhi*), 1,04% (*E. coli*), 1,60% (*P. aeruginosa*) y 1,31% (*S. aureus*), mientras que para el Caldo Lethen + producto (Jarabe a base de *Hedera hélix*) + inóculo fueron 6,27% (*S. typhi*), 2,28% (*E. coli*), 3,64% (*P. aeruginosa*) y 4,44% (*S. aureus*). Estos resultados indican que el método es confiable bajo las condiciones en las que se llevó a cabo, ya que los %CV fueron menores al 15% como lo establece la referencia oficial para productos no estériles [5].
- d) **Límite de detección y cuantificación:** se obtuvo un recuento de microorganismos menor de 100 UFC/mL, siendo más bajo que en las diluciones con la cepa de prueba, el recuento observado en Agar Digerido Caseína y Soya + neutralizantes y en el Agar Lethen) es similar en las placas de medio con producto y medio con microorganismo.
- e) **Tolerancia:** no se observó variación de crecimiento en los dos medios de cultivo evaluados (Agar Digerido Caseína y Soya + neutralizantes y en el Agar Lethen), obteniendo un recuento similar (cuantificación) de los diferentes microorganismos ensayados, esto se confirmó mediante los %R obtenidos que fueron mayores al 70%, límite establecido por la

referencia oficial [5]. Estos resultados sugieren que se desarrolló un método confiable y aceptable.

- f) **Robustez:** el % de recuento microbiano fue equivalente en los dos medios de cultivo utilizados durante el análisis del método de cuantificación (Agar Digerido Caseína y Soya + neutralizantes y Agar Lethen), con un porcentaje de recuperación mayor al 70% en las BAM, indicando que el método es robusto y no es afectado por la utilización del medio de cultivo como el Agar Lethen.

#### **Método cualitativo:**

- a) **Especificidad:** se visualizó el crecimiento característico positivo de *E. coli* en el Agar MacConkey y negativo cuando se inoculó esta bacteria en Agar Manitol Salado, estos resultados se verificaron con cada una de las cepas utilizadas, así mismo se realizaron los controles positivos y negativos obteniendo resultados conformes.
- b) **Límite de Detección:** se apreció crecimiento característico de *E. coli* en el Agar MacConkey y de *S. typhi* en el Agar con Sulfito de Bismuto, siendo el resultado conforme al observar que las colonias de dichas bacterias tenían la forma y color característicos en los medios de cultivo selectivos.
- c) **Tolerancia:** el medio de cultivo caldo MacConkey es el indicado para pre enriquecimiento y posterior aislamiento e identificación de la cepa de *E. coli* (USP 41). Para evaluar la tolerancia se cultivó esta cepa en Caldo Digerido de Soja y se estrió en Agar MacConkey (se utilizaron dos lotes y marcas comerciales diferentes), obteniendo colonias características en el medio, obteniendo resultados conformes y demostrando que el método tolera cambios tales como el no realizar el pre enriquecimiento sino el estriado directo en medio selectivo Agar MacConkey.
- d) **Robustez:** se evaluó mediante la ejecución de los análisis microbiológicos en diferentes días, cambiando las variables ambientales realizando los análisis en diversas áreas, obteniendo resultados similares y confiables, por lo cual el método es conforme.

## CONCLUSIONES

La metodología alternativa propuesta para el control de calidad microbiológica de fitofármacos y fitomedicamentos utilizando Caldo Letheen permitió cuantificar bacterias aerobias mesófilas, mohos y levaduras y cualificar microorganismos específicos tales como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi* considerados microbiota objetable dentro de los criterios de aceptación para la calidad microbiológica de formas farmacéuticas no estériles. Por otra parte, las pruebas preliminares y la verificación de la metodología, permitió garantizar la confiabilidad de los resultados. De igual modo, los parámetros de validación establecieron que el método es específico, preciso, sensible, tolerante y robusto para la evaluación microbiológica cuali-cuantitativa de fitofármacos y fitomedicamentos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Canil A, Guffanti M, Verón L, Zaccardo R, Bitonte L, Mariani G, Rodríguez Y. Métodos microbiológicos alternativos: revisión del proceso de validación para la implementación en la industria farmacéutica. Instituto Nacional de Medicamentos; Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. 2020. [Página web]. [acceso: 22 de julio de 2022]. Disponible en: ([https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/metodos\\_microbiologicos\\_alternativos\\_cr6.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/metodos_microbiologicos_alternativos_cr6.pdf))
- [2] Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Métodos Analíticos. Agilent Technologies. España. 2001. p. 135-153
- [3] Ortega M, Rodríguez C, Zhurbenko R. Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. Rev. Cubana Hig. y Epidemiol. 2013. 51. (1). p. 111-121.
- [4] Do Val, R y Faria Lemos, M. (s.f.) Validación Secundaria de Método Microbiológico: un ejemplo. TECAM Laboratorios. [Página web]. [acceso: 1 de julio de 2022]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/421731689/9-35-Validacion-Secundaria-de-Metodo-Microbiologico>
- [5] The United States Pharmacopeia (USP) 41. Printed by National Publishing, Philadelphia, P.A. 2018. p. 6474, 6380, 7821.
- [6] Morales, M y Morales J. Plantas medicinales, fitofármacos, y fitomedicamentos: hacia una fitomedicina basada en la evidencia científica. En: Plantas Medicinales y Medicina Natural. Chile. Editorial Ocho Libros. 2015. p. 54
- [7] Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. 2013. [Página web]. [acceso: 13 de julio de 2022]. Disponible en: ([www.who.int](http://www.who.int))
- [8] Camaró M, Catalá V, Cardona C, Martínez R, Olmos P. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos en procedimientos en microbiología clínica. Editores: Cercenado E, Cantón R. Editorial EIMC. 2013. p. 1-35.
- [9] Statologos. [Página web]. [acceso: 18 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://statologos.com/como-leer-la-tabla-de-distribucion-f/>.

**Clody Yudith Rojas Gelves:** Farmacéutico egresada de la Universidad de Los Andes (ULA, 2002). Magister Scientiae en Química de Medicamentos (ULA, 2015). Profesora Ordinaria categoría Agregado adscrita al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA (2009-2022). ORCID: 0000-0002-3896-9955

**Alida Alejandra Pérez Colmenares.** Farmacéutico egresada de la Universidad de Los Andes (ULA, 2003). Magister Scientiae en Química de Medicamentos (ULA, 2011). Doctor en Química Aplicada, Mención Química Orgánica (ULA, 2012). Profesora del Postgrado en Química de Medicamentos adscrita al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA (2012-2022). ORCID: 0000-0001-8910-4663