



APTITUD DEL MÉTODO MICROBIOLÓGICO DE ANÁLISIS DE UN PRODUCTO
FARMACÉUTICO LÍQUIDO, ELABORADO EN EL LABORATORIO DE
FARMACOLOGÍA VEGETAL (LABFARVE)

LISETH MAYERLI HERNANDEZ CABALLERO

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

2023

APTITUD DEL MÉTODO MICROBIOLÓGICO DE ANÁLISIS DE UN PRODUCTO
FARMACÉUTICO LÍQUIDO, ELABORADO EN EL LABORATORIO DE
FARMACOLOGÍA VEGETAL (LABFARVE)

LISETH MAYERLI HERNANDEZ CABALLERO

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar por el título de

MICROBIÓLOGA

Tutor Académico: Ph. D. Ramón Ovidio García Rico

Universidad de Pamplona

Tutor empresarial: María Carolina Benavides Muñoz

Microbióloga - LABFARVE

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

2023

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo general	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. MARCO REFERENCIAL	15
4.1. Marco Teórico	15
4.1.1 Productos Fitoterapéuticos	15
4.1.1.1. Clasificación de los productos fitoterapéuticos	15
4.1.2. Valeriana	16
4.1.2.1. Origen	16
4.1.2.2. Usos populares de la valeriana	17
4.1.2.3. Composición química	18
4.1.3. Control de calidad	18
4.1.3.1. Validación	19
4.1.3.1.1. Tipos de validación	19
4.1.3.1.1.2. Validación secundaria o verificación	20
4.1.3.2. Verificación de la aptitud del método microbiológico	20
4.1.4. Cepas certificadas	21
4.1.5. Cepas KWIK STIK	22
4.2. Antecedentes	26
4.3. Bases legales	27
4.3.1. Normatividad internacional	27
4.3.2. Normatividad nacional	30
5. METODOLOGÍA	32
5.1. Aptitud del método para aerobios mesofilos y Mohos y levaduras según USP <61> en presencia y ausencia de Valeriana solución oral x60ml	40
5.1.1. Aptitud del método para aerobios mesofilos en ausencia de Valeriana solución oral	40
5.1.2. Aptitud del método para aerobios mesofilos en presencia de Valeriana solución oral	40
5.1.3. Aptitud del método para mohos y levaduras en ausencia de Valeriana solución oral	41
5.1.4. Aptitud del método para mohos y levaduras en presencia de Valeriana solución oral	41

5.2.	Aptitud del método para microorganismos específicos según USP <62>	42
5.2.1.	Aptitud del método para microorganismos específicos en presencia de Valeriana solución oral.....	42
5.2.2.	Aptitud del método para microorganismos específicos en ausencia de Valeriana solución oral específicos según USP 62	42
5.3.	Análisis de rutina interno del producto Valeriana solución oral	43
5.3.1.	Recuento de aerobios mesofilos; mohos y levaduras	43
5.3.2.	Recuento de microorganismos específicos: <i>Escherichia coli</i>	43
5.3.3.	Recuento de microorganismos específicos: <i>Salmonella</i> Thiphymurium	44
5.4.	Verificación del método microbiológico	44
6.	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	45
7.	RESULTADOS Y ANALISIS.....	46
7.1.	Aptitud del método para aerobios mesofilos, mohos y levaduras en presencia de Valeriana solución oral.....	48
7.2.	Aptitud del método para microorganismos específicos en el producto Valeriana solución oral x 60 ml.....	49
7.2.1.	Análisis del producto.....	50
7.3.	Verificación de la aptitud del método	51
8.	CONCLUSIONES.....	53
9.	RECOMENDACIONES.....	54
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	55
11.	ANEXOS	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Matriz de estudio.....	32
Tabla 2.	Especificaciones microbiológicas para la Valeriana solución oral.....	32
Tabla 3.	Equipos utilizados.....	33
Tabla 4.	Medios de cultivo utilizados	34
Tabla 5.	Reactivos para identificación microscópica.....	34
Tabla 6.	Prueba de Promoción y crecimiento para los medios usados en la verificación	35
Tabla 7.	Cepas utilizadas para el método cuantitativo.....	37

Tabla 8. Cepas utilizadas para el método cualitativo (Ausencia/Presencia).....	38
Tabla 9. Control microbiológico de los medios de cultivo empleados en el análisis microbiológico del producto Valeriana solución oral.....	46
Tabla 10. Resultado de la estandarización del inóculo	47
Tabla 11. Resultados para el recuento de aerobios mesófilos, mohos y levaduras en presencia del producto Valeriana solución oral	48
Tabla 12. Resultados para el recuento de aerobios mesofilos, mohos y levaduras en ausencia del producto Valeriana solución oral	48
Tabla 13. Detección de Presencia / Ausencia de microorganismos específicos en presencia y ausencia del Producto Valeriana solución oral.	49
Tabla 14. Análisis del producto Valeriana solución oral de los lotes 2865072, 2970092 y 3077122.....	50
Tabla 15. Porcentaje de recuperación	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Preparación del cultivo (Microbiologics, 2021).....	39
Figura 2. Recuperación del cultivo (Microbiologics, 2021).....	39
Figura 3. <i>Salmonella</i> Typhimurium en objetivo de 100x	88
Figura 4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en objetivo de 100x	88
Figura 5. <i>Bacillus subtilis</i> en objetivos de 100x	88
Figura 6. <i>Staphylococcus aureus</i> en objetivo de 100x.....	88
Figura 7. <i>Escherichia coli</i> en objetivo de 100x	89
Figura 8. <i>Candida albicans</i> en objetivo de 100x	89
Figura 9. <i>Aspergillus brasiliensis</i> en objetivo de 100x.....	89

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Criterios de aceptación para la calidad microbiológica de las formas farmacéuticas no estériles USP <1111>.....	65
Anexo 2. Certificados medios de cultivo empleados.....	66
Anexo 3. Certificados de las cepas de trabajo utilizadas	73
Anexo 4. Neutralizantes comunes aceptados por la USP capítulo <61>.....	87
Anexo 5. Control microbiológico de la siembra: Ambientes.	87
Anexo 6. Control microbiológico de la siembra: Superficies.....	87
Anexo 7. Tinción de Gram para Aerobios mesófilos y Tinción de azul de metileno para mohos y levaduras.....	88
Anexo 8. Pruebas bioquímicas	89

RESUMEN

La verificación del método utilizando las distintas condiciones de trabajo es necesaria y exigida en Colombia por el decreto 1156 de 2018 del Ministerio de Protección Social para comprobar que la metodología a emplear en los análisis es el correcto. Para evaluar la aptitud del método se realizaron recuentos de aerobios mesofilos, mohos, levaduras y se llevaron a cabo pruebas de microorganismos específicos, en presencia y ausencia del producto dependiendo lo establecido en la Convención de la Farmacopea de Estados Unidos (USP) capítulo <61> y <62>. Los mismos, se hicieron con cepas certificadas las cuales fueron: *Bacillus subtilis* ATCC® 6633TM, *Escherichia coli* ATCC® 8739TM, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538TM, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027TM, *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028TM, *Candida albicans* NCPF 3179 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC® 16404TM; para poder demostrar la aptitud del método en cada lote, el porcentaje de recuperación obtenido debía estar entre 50% - 200% y obtener presencia de los microorganismos específicos inoculados verificando que las características del microorganismo tanto macroscópicas como microscópicas correspondían a la cepa utilizada. Los resultados obtenidos fueron conformes a los criterios de aceptación establecidos. De acuerdo al estudio realizado, se pudo demostrar mediante las pruebas de enumeración y recuperación de los microorganismos específicos, que el método para el análisis microbiológico de productos no estériles de la USP vigente es apropiado para ser usado en el análisis microbiológico del producto Valeriana solución oral x 60 ml, elaborado y comercializado en LABFARVE.

ABSTRACT

The verification of the method using the different working conditions is necessary and required in Colombia by decree 1156 of 2018 of the Ministry of Social Protection to verify that the methodology to be used in the analyzes is correct. To evaluate the aptitude of the method, counts of aerobic mesophiles, molds, yeasts were carried out, and tests of specific microorganisms were carried out, in the presence and absence of the product according to the provisions of the United States Pharmacopeia Convention (USP) chapter <61> and <62>. They were made with certified strains which were: *Bacillus subtilis* ATCC® 6633TM, *Escherichia coli* ATCC® 8739TM, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538TM, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027TM, *Salmonella Typhimurium* ATCC® 14028TM, *Candida albicans* NCPF 3179 and *Aspergillus brasiliensis* ATCC® 16404TM; In order to demonstrate the aptitude of the method in each batch, the recovery percentage obtained must be between 50% - 200% and obtain the presence of the specific inoculated microorganisms, verifying that both the macroscopic and microscopic characteristics of the microorganism correspond to the strain used. The results obtained were in accordance with the established acceptance criteria. According to the study carried out, it was possible to demonstrate through the enumeration and recovery tests of the specific microorganisms, that the method for the microbiological analysis of non-sterile products of the current USP is appropriate to be used in the microbiological analysis of the Valeriana oral solution product. x 60 ml, produced and marketed at LABFARVE.

1. INTRODUCCIÓN

La Fundación Laboratorio de Farmacología Vegetal (LABFARVE) fue fundada en 1984, después de ser, por varios años, una unidad de investigación de la Fundación Clínica Hospital Juan N. Corpas. Posicionándose como pionero de la industria naturista en la investigación y producción de extractos de plantas medicinales. Desde entonces, se orientó al desarrollo de preparaciones farmacéuticas, principalmente a base de plantas medicinales colombianas, las cuales se puedan usar como una terapia alternativa; sin embargo, no busca reemplazar la medicina tradicional, pero sí servir como un refuerzo y complemento de esta (Labfarve, 2023).

Es importante mencionar que, Colombia tiene una rica biodiversidad y se sabe que posee 29.769 especies de plantas distribuidas en más de 400 familias y 3000 géneros, siendo las familias más abundantes *Orchidaceae*, *Fabaceae*, *Asteraceae*, *Rubiaceae* y *Melastomataceae* (González et al., 2022). Además, según el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (2019) Colombia es el segundo país más biodiverso del mundo con más de sesenta mil especies vegetales, de las cuales aproximadamente seis mil son medicinales. Lo que conlleva a que el empleo de estas sea, no sólo factible por su actividad fitoterapéutica, o porque su empleo disminuye en gran medida el uso de antibióticos indiscriminadamente, sino porque tiene un impacto positivo tanto económico, como ambiental.

Por otro lado, LABFARVE cuenta con la certificación de cumplimiento de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) desde el año 2012 por parte del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), y con el certificado ecológico por parte de Biotrópico el cual garantiza las Buenas Prácticas Agrícolas de sus cultivos de plantas medicinales, libres de metales pesados y pesticidas, rigiéndose a su vez por la Farmacopea de

los Estados Unidos. Dichos certificados y normas hacen que se cuente con procesos de fabricación estandarizados para la manufactura de sus productos, con controles estrictos de calidad durante los procesos, con estudios microbiológicos y fisicoquímicos tanto de las materias primas como de los materiales de envase y empaque de los productos; estudios de estabilidad y toxicidad, que determinan su seguridad y eficacia, los cuales inician desde la recepción de la materia prima como planta fresca hasta el producto terminado asegurando la trazabilidad del mismo (Labfarve, 2023).

Cabe mencionar que todos los productos actuales del portafolio de LABFARVE son no estériles, por lo que están sujetos a contaminación microbiana, la cual, además de alterar sus características organolépticas, pueden alterar la composición de la fórmula y ocasionar daños en el consumidor. Por lo tanto, para verificar que las metodologías farmacopeicas permiten recuperar los microorganismos en los diferentes productos elaborados, se eligió la Valeriana solución oral (Gotas) x 60 ml para realizar el presente estudio y, de este modo, demostrar que los procedimientos de recuento de aerobios mesófilos, mohos y levaduras y las pruebas de ausencia/presencia de microorganismos específicos emitidos por la USP vigente para productos no estériles son apropiados para el análisis de rutina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Verificar la aptitud del método microbiológico para determinar la calidad microbiológica del producto fitoterapéutico Valeriana solución oral (Gotas) x 60 ml elaborado en LABFARVE.

2.2. Objetivos específicos

- Establecer la aptitud del método de recuento en placa para la determinación de aerobios mesófilos y mohos y levaduras, en ausencia y presencia del producto fitoterapéutico Valeriana solución oral (Gotas) x 60 ml.
- Determinar la aptitud del método para la determinación de microorganismos específicos en presencia y ausencia del producto terminado Valeriana solución oral (Gotas) x 60 ml.
- Evaluar la reproducibilidad de los métodos microbiológicos utilizados en LABFARVE para el análisis de rutina interno, mediante el cálculo de exactitud.

3. JUSTIFICACIÓN

La valeriana es una planta muy popular en países de Europa y América por sus propiedades sedantes y ansiolíticas en humanos (Medina et al., 2008). Los sesquiterpenos como el ácido valeriánico y el valepotriato, los cuales se encuentran en la raíz de la valeriana son los compuestos que actúan de forma sinérgica contribuyendo en la actividad fisioterapéutica de la misma, los cuales ejercen una acción reguladora del sistema nervioso central interactuando con los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA), promoviendo el ingreso de cloro y ocasionando la inhibición neural (Fernández et al., 2004). Dietz et al. (2005) en su estudio demuestra que aunque parece que el receptor GABA es el principal implicado en la actividad hipnótica, hay otros receptores que también intervienen; tales como los receptores 5-HT_{5a} de la serotonina, dado que un extracto de éter de petróleo obtenido de la raíz de valeriana y rico en ácido valerénico se comportó como agonista parcial dichos receptores, los cuales tienen relación con el ritmo circadiano (sueño-vigilia) en el ser humano, y por ende, su actuación contribuye igualmente a explicar la actividad fisioterapéutica de la valeriana.

Las gotas de valeriana elaboradas en LABFARVE son usadas como sedante; coadyuvante en el tratamiento de la ansiedad y trastornos del sueño de origen nervioso. Este es uno de los productos estrella ofrecidos por el laboratorio; sin embargo, actualmente no cuenta con una verificación del método que determine que los procedimientos utilizados para la evaluación microbiológica del producto son aptos; dado que las gotas de valeriana son un producto no estéril y dichos productos son susceptibles a la contaminación con microorganismos durante el proceso de fabricación: desde la materia prima, hasta el producto terminado. En consecuencia, dicha contaminación, puede tener el potencial de reducir o inactivar la actividad farmacoterapéutica del principio activo y por ende representar un riesgo

para la salud del cliente; o, dependiendo de su patogenicidad puede ocasionar infecciones o enfermedades que afecten al mismo. Por otra parte, el deterioro microbiano podría conllevar a cambios en las características físicas y químicas que conducirán a que el producto no sea apto para ser usado, afectando con ello la imagen de la empresa. Es por esta razón, que se hace necesaria la verificación del análisis microbiológico, para poder demostrar que se cumplen con las especificaciones establecidas por los organismos oficiales. Del mismo modo LABFARVE, en el desarrollo y aplicación de sus protocolos, se rige por la USP (Convención de la Farmacopea de Estados Unidos) vigente; la cual es una entidad fundada en 1820, que se encarga de desarrollar normas de calidad para medicamentos y alimentos, así pues, establece ciertos parámetros que aseguran la calidad y estabilidad de productos como suplementos dietarios, medicamentos, e ingredientes alimenticios (USP, 2013). En Colombia, la entidad que se encarga de verificar el cumplimiento de dichos parámetros y de que se cumpla esta normativa es el INVIMA.

Por otro lado, los ensayos de aptitud ofrecen la oportunidad de realizar comparaciones y tener una valoración independiente de los datos del laboratorio en relación con los valores de referencia (o de otros criterios de desempeño) o para el desempeño de los laboratorios similares (Pretel, 2015). Por ende, dichos datos proporcionan información confiable de que los métodos usados en el laboratorio para cuantificar o estimar la presencia de microorganismos específicos es confiable y adecuado. Para cualquier empresa es importante contar con ensayos de aptitud del método en todos sus productos, ya que, sin ellos, una promoción del medio positiva, un recuento con o sin colonias, o la determinación de ausencia de microorganismos específicos, no se asegura que el resultado o la liberación del producto obtenida es la verdadera estimación de la población microbiana existente en el producto o muestra analizada.

Por tal motivo, a pesar de que los ensayos de control microbiológico para productos farmacéuticos no estériles se encuentren estandarizados en la USP y desarrollados en la Resolución 1160 del 2016 del Ministerio de Salud y Protección Social , la cual establece que se debe realizar la aptitud de los métodos; es importante tener en cuenta que no todos los productos farmacéuticos pueden adecuarse a esta metodología, ya sea por su naturaleza, conservantes, su clasificación (si es un producto cosmético, fitoterapéutico, magistral, etc.), por lo que es indispensable realizar una verificación del método que permita una estandarización del ensayo para la Valeriana solución oral (Gotas) x 60 ml elaborado en LABFARVE, que asegure que se cumplen con los estándares de calidad y que dicho producto se pueda comercializar y exportar.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1. Marco Teórico

4.1.1 Productos Fitoterapéuticos

La fitoterapia es la ciencia que estudia los productos vegetales con una finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, curar o aliviar enfermedades. Su ámbito de actuación se centra mayormente en enfermedades leves o moderadas y como tratamiento coadyuvante de enfermedades crónicas. La terapia con plantas medicinales es menos agresiva, tiene menos efectos secundarios, contraindicaciones e interacciones y es mejor tolerada (Avello & Cisternas., 2010). El decreto 1156 del 2018 del Ministerio de Protección Social de Colombia define un producto Fitoterapéutico como un producto con presentación farmacéutica cuyos principios activos provienen de una planta medicinal, natural o asociación de la misma, generalmente en forma de extractos, aceites o tinturas y se utiliza con fines terapéuticos; además, no tiene sustancias químicamente definidas (Decreto 1156, 2018). En LABFARVE los medicamentos fitoterapéuticos tienen varias formas farmacéuticas; cápsulas, soluciones orales, y jarabes; todos cuentan con su control de calidad y su debido proceso tanto microbiológico como fisicoquímico cumpliendo con las especificaciones de la USP para cada tipo de producto.

4.1.1.1. Clasificación de los productos fitoterapéuticos

El decreto 1156 del 2018 del Ministerio de Protección Social de Colombia clasifica los productos fitoterapéuticos en:

“Preparaciones farmacéuticas con base en plantas medicinales (PFM). Son productos que se elaboran a partir de material de la planta medicinal, o preparados de la

misma, a la cual se le ha comprobado actividad terapéutica y seguridad farmacológica, además está incluido en las normas farmacológicas colombianas o en el listado de plantas medicinales para productos fitoterapéuticos de la categoría preparaciones farmacéuticas con base en plantas medicinales. Su administración se realiza para indicaciones definidas y se utiliza para la prevención, alivio, diagnóstico, tratamiento, curación o rehabilitación de la enfermedad

Producto fitoterapéutico de uso tradicional (PFT): Es aquel producto elaborado a partir de material de planta medicinal o asociaciones entre sí cultivadas en Colombia y que además está incluido en el listado de plantas medicinales para productos fitoterapéuticos de uso tradicional, en las formas farmacéuticas aceptadas cuya eficacia y seguridad, aún sin haber realizado estudios clínicos, se deduce de la experiencia por su uso registrado a lo largo del tiempo y, en razón de su inocuidad, está destinado para el alivio de manifestaciones sintomáticas de una enfermedad.

Producto fitoterapéutico de uso tradicional importado (PFTI): Es aquel producto fitoterapéutico elaborado a partir de planta medicinal o asociaciones entre sí, que esté incluido en el listado de plantas medicinales para productos fitoterapéuticos de uso tradicional, en las formas farmacéuticas aceptadas, cuya eficacia y seguridad, aún sin haber realizado estudios clínicos, se deduce de la experiencia por su uso registrado a lo largo del tiempo y que en razón de su inocuidad, está destinado para el alivio de manifestaciones sintomáticas de una enfermedad” (Decreto 1156, 2018).

4.1.2. Valeriana

4.1.2.1. Origen

El género *Valeriana* pertenece a la familia Caprifoliaceae, es una especie herbácea perenne, es decir puede vivir más de tres años, abarca aproximadamente más de 250 especies

en todo el mundo y se caracteriza por sus hojas agrupadas en roseta en la base y opuestas en el tallo. (Kutschker, 2011). Es originaria del Norte de Europa y Asia. Los órganos vegetativos subterráneos como las raíces, rizomas y estolones de muchas plantas de *Valeriana*, como *Valeriana officinalis* L., *Valeriana jatamansi* Jones y *Valeriana amurensis* se han utilizado como medicina tradicional en el tratamiento de estados neurotóxicos de varias enfermedades, especialmente como un sedante suave en trastornos del sueño o en casos de ansiedad (Dong et al., 2015). La valeriana es conocida vulgarmente en algunas regiones o grupos étnicos como hierba de los gatos, dado que cuando la planta está fresca no tiene olor, pero cuando se seca se desarrolla un olor fuerte y característico, desagradable, y esto ocurre por la hidrólisis de algunos de los componentes de su aceite esencial que liberan ácido isovalérico (Navarro et al., 2008). Otras especies del género *Valeriana* se utilizan también para la obtención de principios activos: *V. edulis* Nutt. spp. *procera* o valeriana mejicana y *V. wallichii* DC. o valeriana de la India (Marcucci, et al., 2020).

4.1.2.2. Usos populares de la valeriana

El extracto de la raíz de valeriana (*Valeriana officinalis*), una planta con flores, ha sido ampliamente utilizada desde la antigüedad para tratar los trastornos del sueño en Europa durante décadas. Anteriormente los médicos griegos y romanos la prescribían como diurético, analgésico e incluso contra la tos. Además, tradicionalmente se ha usado también en casos de ansiedad, nerviosismo, insomnio e incluso como espasmolíticos. Adicionalmente, se ha utilizado ampliamente en varios lugares del mundo para combatir el dolor de cabeza, en cólicos intestinales, dolor pélvico durante la menstruación, dolores reumáticos; por vía tópica en cortaduras, pequeñas inflamaciones e incluso para el acné (Fresno, y Accame., 2001; Angerhofer., 2001).

4.1.2.3. Composición química

La composición química de la valeriana contiene principalmente sesquiterpenos e iridoides, todos ellos compuestos de naturaleza terpénica. Los sesquiterpenos son se oxidan y pueden ser cetonas como la valeranona, alcoholes como el valerianol o el alcohol kesílico, ésteres como el éster del valerianol, aldehídos como el valerenal y ácidos como el ácido valerénico, acetoxivalerénico e hidroxivalerénico; mientras que, los iridoides son triésteres de alcoholes derivados del iridano con ácidos de bajo peso molecular, acético, isovalérico, etc. Las diferencias estructurales entre ellos radican en la naturaleza de los ácidos alifáticos que esterifican las funciones hidroxílicas en 1, 7 y 11. Entre ellos se encuentran valtrato, isoaltrato, acevaltrato, dihidroaltrato e isovalerohidroxidihidroaltrato. La concentración total de valepotriatos se encuentra generalmente entre el 0,5% y el 1,2 %, siendo el mayoritario el valtrato. Todos estos compuestos son muy inestables, especialmente en ambientes ácidos; también se modifican por la humedad o el calor, originando aldehídos no saturados (Castillo & Martinez., 2021).

4.1.3. Control de calidad

Una herramienta que tiene una influencia significativa en el diagnóstico clínico, la salud pública y el medio ambiente es el desarrollo y aplicación de análisis microbiológicos en el control de calidad. (Camaró et al., 2015). Por tanto, la necesidad de implementar métodos microbiológicos, fisicoquímicos y organolépticos que garanticen la calidad de los productos fitoterapéuticos nace de la demanda de dichos productos medicinales que se usan como coadyuvantes de medicamentos sintetizados a partir de formulación química.

Por otro lado, debido a que estos productos son elaborados con plantas naturales están sujetos a que dichas plantas sufran deterioro o fácil contaminación, lo cual puede afectar la naturaleza del producto, por tal motivo, es de suma importancia realizar el control de calidad

a las materias primas vegetales, materias primas sintéticas, productos en proceso, productos terminados, materiales de envase, entre otros (Daste, 2015). Asimismo, Sharapin (2000) afirma que la contaminación microbiológica afecta principalmente al usuario final, debido a que se puede generar la aparición de microorganismos patógenos o metabolitos secundarios de tipo tóxicos como las micotoxinas, endotoxinas de origen bacteriano y a su vez, la transformación microbiana de compuestos propios de las plantas medicinales en compuestos de tipo tóxicos .

4.1.3.1. Validación

La Resolución 1160 de 2016 del Ministerio de Salud de Colombia define validación como la “acción de comprobar, en concordancia con los principios de las BPM, que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistemas realmente conduce a los resultados esperados”. En otras palabras, mediante la validación se quiere confirmar mediante un examen o evidencias objetivas el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto de los procedimientos analíticos; dichos procedimientos deben contar con validaciones, para las cuales deben existir requisitos preestablecidos con un uso previsto que confirme la adecuación de las mismas en el laboratorio, manifestando que dicho procedimiento posee características de funcionamiento adecuadas, garantizando a su vez que los métodos cumplen determinados criterios, en términos de precisión, exactitud, etc.(Camaró et al., 2015).

4.1.3.1.1. Tipos de validación

4.1.3.1.1.1. Validación primaria

Es un proceso exploratorio diseñado para determinar las características de rendimiento y las limitaciones operacionales de un método nuevo o modificado; el cual debe

proporcionar especificaciones de rendimiento cuantitativas y cualitativas, así como incluir descripciones completas, detalladas y precisas de los objetos de interés. Esta validación la deben realizar los laboratorios al desarrollar e implementar kits de diagnóstico, pruebas nuevas, procedimientos desarrollados para uso interno o al combinar métodos estandarizados o no estandarizados en un solo protocolo (Padilla, 2007).

4.1.3.1.1.2. Validación secundaria o verificación

Por otro lado, la verificación se realiza cuando un laboratorio quiere implementar un dispositivo, método estándar o prueba de diagnóstico, desarrollado y validado en otro lugar, principalmente por organismos internacionales. El objetivo de esta validación es reunir evidencia de que el laboratorio es capaz de cumplir con las especificaciones establecidas en la validación primaria, en consecuencia debe proporcionar evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos establecidos en la estandarización, con las características que se han publicado y aceptado (SADCAS, 2018).

4.1.3.2. Verificación de la aptitud del método microbiológico

Es el conjunto de aquellos procesos que permiten conocer si los resultados obtenidos para dicho método son similares y eficaces como los alcanzados por los métodos de referencia, es decir, permite evaluar la reproducibilidad del método en cualquier laboratorio, obteniendo de este modo, resultados confiables (Qvist, 2007). Por ende, cualquier industria, no solo la industria farmacéutica o fitoterapéutica debe contar con validaciones o verificaciones de los métodos para cada uno de sus productos y de esta manera disminuir el riesgo de resultados erróneos o falsos negativos. La Resolución 3619 de 2013 del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia establece que en un producto farmacéutico que se está analizando por primera vez se debe confirmar que los excipientes, conservantes, etc.,

presentes no interfieren sobre los microorganismos; lo cual se hace inoculando microorganismos de manera intencional en la muestra a lo que se considera como ensayo de aptitud o idoneidad del método (Resolución 3619, 2013).

4.1.4. Cepas certificadas

Una cepa es un conjunto de especies de microorganismos que comparten características únicas. Por tanto, las cepas certificadas son un material biológico de referencia certificado, es decir la colección certifica que determinada cepa es un cultivo puro y que al mismo se le han realizado las respectivas pruebas bioquímicas y moleculares (Burguet, 2012). Para poder llevar a cabo la verificación de la aptitud del método en ensayos microbiológicos, se debe hacer uso de cepas certificadas que permitan la identificación de un microorganismo en particular y, que también posean características análogas a las patógenas. Es fundamental el control y seguimiento de las condiciones de almacenamiento de las cepas (Origen, sistema de preservación, temperatura de almacenamiento, pureza, tipificación, número de repiques, etc.) y de este modo conservar su vida útil. Además, deben proceder de centros especializados en cultivos microbianos, donde se pueda realizar la trazabilidad del origen y mantenimiento de las cepas. Como por ejemplo: ATCC: American Type Culture Collection (Estados Unidos); CIP: Collection de Bactéries de L' Institut Pasteur (Francia); NCTC: National Collection of Type Cultures (Inglaterra); IMI : International Mycological Institute (Inglaterra); DSMZ: Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen (Alemania), las cuales abarcan un sinnúmero de microorganismos certificados utilizados para el control de calidad microbiológico (Morales, 2018). Además, el hecho de utilizar diferentes microorganismos brinda la posibilidad de alcanzar variabilidad en los ensayos y de esta manera, evaluar la forma en la que se comporta el producto, con respecto a dicha cepa, por lo tanto, el uso de cepas robustas y específicas es de mucha importancia (Cerra et al., 2013)

Es importante considerar que los cultivos de trabajo no deben sobrepasar los cinco repiques o pasajes de la cepa de referencia original (se considera un pasaje a toda aquella multiplicación celular en un medio de cultivo) y estos cultivos deben ser subcultivos primarios de los stocks de referencia, las mismas que deben ser almacenadas en alícuotas ya sea liofilizadas o congeladas (WHO, 2011). Por otro lado, en cada pasaje aumenta la probabilidad de acumulación de mutaciones en el genoma bacteriano.

4.1.5. Cepas KWIK STIK

Los dispositivos KWIK STICK, presentan una cepa de microorganismo liofilizado, una ampolla de líquido hidratante y un hisopo de inoculación. Cada dispositivo está sellado dentro de una bolsa laminada que contiene material desecante para evitar la acumulación perjudicial de humedad. Los microorganismos y su recuperación están garantizados cuando se procesan utilizando los requisitos para la incubación y los medios recomendados. Los microorganismos de KWIK-STIK están en el tercer pase del cultivo de referencia, son previstos para usarse como control y de esta manera verificar el desempeño de los ensayos, los reactivos y los medios que se usan en las pruebas microbianas para la detección e identificación de microorganismos aislados cultivados, obteniendo resultados equivalentes a los métodos tradicionales utilizados en la preparación, el almacenamiento y el mantenimiento de colecciones de cultivos de inventario de referencia. Las preparaciones de microorganismos son rastreables a la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection, ATCC®) u otra colección auténtica de cultivos de referencia (Microbiologics, 2021).

Algunas de las cepas empleadas para la verificación en microbiología son:

a. ***Asperillus brasiliensis* ATCC 16404:** Son hongos filamentosos hialinos, saprofitos, perteneciente al filo *Ascomycota*. En su morfología están presentes las hifas hialinas septadas, tienen reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios) (Brochard y Le Becle, 2009). Su importancia radica en que es usado como indicador de contaminación ambiental (Krull, et al 2010). Asimismo, tiene un gran impacto positivo en la producción de metabolitos secundarios los cuales son ampliamente utilizados en las industrias de alimentos y fármacos (Vesth, . et al 2018). La industria farmacéutica utiliza esta especie para detectar la contaminación de hongos en sus productos, debido a la alta producción de metabolitos, los cuales son capaces de degradar los compuestos químicos y las características físicas de los productos evaluados, lo cual afecta estudios de estabilidad y almacenamiento (Aghili. et al 2016).

b. ***Escherichia coli* ATCC 8739:** Los microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* son bacilos Gram negativos anaerobios facultativos fermentadores de glucosa (Octavia & Lan, 2014). Las enterobacterias están ampliamente distribuidas en plantas, suelos y en el intestino de humanos y animales. *Escherichia coli* es parte de la biota normal fecal de humanos y algunos animales, sin embargo, algunas cepas pueden producir infecciones del tracto urinario, de heridas, ocasionando ocasionalmente septicemia y meningitis; y a su vez, también está asociada con otros tipos de infecciones como neumonía, abscesos e infecciones intestinales (Lopardo, 2016). Su presencia en un producto de uso o consumo humano implicaría una posible presencia de contaminación fecal en especial en productos de consumo oral y en materias primas de origen natural (Cerra et al., 2013).

c. ***Bacillus subtilis* ATCC 6633:** Es una bacteria Gram positiva, generalmente se usa como modelo biológico en estudios de contaminación ambiental, resistencia a

ambientes extremos y producción de esporas; es conocido, por su habilidad de tolerar condiciones adversas como presión, salinidad y calor (Polka . & Silver 2014). En la industria farmacéutica, la presencia de esta bacteria es utilizada como bioindicador de contaminación ambiental, en el caso, de áreas estériles o máquinas, indica que existen fallas en las buenas prácticas de manufactura o en la infraestructura del área de producción (Sandle, 2014).

d. ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538:** Bacteria Grampositiva con forma de coco. Normalmente este microorganismo se encuentra en los seres humanos, principalmente en la piel, pliegues inguinales, zona nasofaríngea y axilas. Sin embargo, cuando entra en contacto con algunas capas mucosas puede ser altamente patógeno ocasionando así infecciones en piel o tejidos blandos (Pasachova et al., 2019). Para evitar el crecimiento de este microorganismo en los productos, en las industrias farmacéuticas es fundamental tener una limpieza constante y profunda de los equipos, áreas de producción y también del personal que elabora dichos medicamentos (Rivadeneira, 2022). Dado que la presencia del género *Staphylococcus* y particularmente *S. aureus* en una materia prima o producto farmacéutico de tipo fitoterapéutico o cosmético, indica que la fuente de contaminación puede ser humana, es decir de las personas que elaboran el producto. Estos microorganismos pueden ser transportados por la ropa, la piel, el polvo y microgotas de humedad que se generan al realizar acciones como estornudar, hablar o moverse (Götz, et al., 2006).

e. ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027:** Es un bacilo Gram negativo, no fermentador, lo que hace que sea un patógeno ubicuo, estando presente particularmente en el suelo y en el agua (Torres et al., 2012); además es uno de los más importantes patógenos al causar infección crónica o aguda en pacientes inmunodeprimidos (Qin et al., 2022). En la industria farmacéutica, la presencia de este microorganismo se atribuye al

empleo de agua contaminada y la mala conservación de los medicamentos con alto contenido de agua como, por ejemplo: jarabes, gotas, entre otros. Sin embargo, este tipo de contaminación puede detectarse y controlarse mediante el muestreo periódico de las aguas utilizadas en la planta y el aislamiento en medios de cultivo selectivos. Esta y otras bacterias Gram negativas pueden colonizar los sistemas de purificación de agua por la formación de biofilms, las cuales son masas de microorganismos que se acumulan en reservorios de agua, tuberías, equipos o materiales de acero inoxidable y que una vez formadas son muy difíciles de remover con el uso de agentes sanitizantes (Cerra et al., 2013).

f. ***Salmonella Typhymuirum* ATCC 14028:** Es una bacteria Gram negativa anaerobia facultativa, miembro de la familia *Enterobacteriaceae*. En las industrias farmacéuticas es detectado en mucosas o materia fecal que se pueden encontrar en las áreas de producción, esto debido a que su nicho ecológico es netamente patógeno (Rao et al., 2008); por otro lado, por la etiología de este microorganismo es necesaria su identificación en materias primas de origen natural. Por ende, su identificación es primordial en fármacos que van a estar en contacto directo con las fosas nasales, heridas abiertas o productos de administración oral. Ya que su ingestión puede causar muchos tipos de infecciones desde una gastroenteritis autolimitante hasta afecciones generalizadas como la fiebre tifoidea y paratifoidea (Smith et al., 2016).

g. ***Candida albicans* ATCC 10231:** Es un microorganismo Grampositivo unicelular resistente a varios fármacos y que presenta características estructuralmente similares con los hongos que se han desarrollado mediante producción de pseudohifas. Asimismo, hace parte de un grupo de levaduras que resultan sumamente patógenas para cualquier organismo, especialmente en zonas donde se acumulan mucosas bucal y vaginal (Dadar et al., 2018). Normalmente, se encuentra en la cavidad oral, en el tracto

gastrointestinal y en la vagina. Su patogenicidad provoca; candidiasis, presentándose como vaginitis, el cual es una afección vaginal, muguet (afección en la cavidad oral), afecciones de la piel o del tracto gastrointestinal (Talapko et al., 2021).

4.2. Antecedentes

Perilla (2013) en su estudio titulado “Verificación de la aptitud de las pruebas de recuento microbiano y pruebas de microorganismos específicos para productos terminados elaborados en Anglopharma S.A”, demostró, mediante los ensayos de enumeración y recuperación de microorganismos específicos, la idoneidad del método USP de análisis microbiológico para productos terminados de naturaleza semisólida, líquida, productos de uso vaginal y capsulas de gelatina es apropiado, ya que, obtuvo resultados dentro del rango de los criterios de aceptación que establece la normativa.

Por otro lado Morales (2018) en su tesis “Validación del examen microbiológico del Bicarbonato de sodio y sulfadiazina de plata según USP vigente” utilizando la metodología de recuento en placa de los capítulos <61> y <62> de la USP destaca que para la prueba de microorganismos específicos de sulfadiazina de plata es importante mantener en incubación el medio de cultivo de enriquecimiento por no menos de 48 h para asegurar la recuperación de microorganismos, debido posiblemente a una actividad bacteriostática de la muestra.

Adicionalmente, Sueros (2013), en su tesis “Validación de un método de ensayo cuali-cuantitativo para el análisis microbiológico del jarabe Tyrex a nivel intralaboratorial” utilizó la metodología de los capítulos <61> y <62> de la USP, demostrando que el método tiene la capacidad de detectar los microorganismos de prueba en presencia del producto con un porcentaje de recuperación mayor al 70 %. Además, comprobó que el método detecta y

cuantifica 5 UFC/ml como la mínima cantidad de *Salmonella Typhimurium* y *Escherihcia coli* que pueden ser detectables y cuantificables en su matriz de estudio.

Por otra parte, Arias et al., (2013) en su artículo “Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado, elaborado en una industria farmacéutica” en el cual siguiendo las técnicas de análisis propuestas por la USP y evaluando parámetros como precisión, repetitividad, selectividad y robustez obtuvo resultados acordes con lo establecido, destacando que la metodología es reproducible y robusta al tener la capacidad de no ser afectada por variaciones al desarrollar la técnica, lo cual genera resultados confiables y precisos, demostrando una conformidad en la totalidad de los parámetros evaluados.

Finalmente, Rivadeneira (2020) en su tesis titulada “Validación de aptitud del método microbiológico de recuento y microorganismos específicos para sulfametoxazol + trimetoprima en tableta recubierta” utilizó métodos de inoculación directa de acuerdo a la USP (USP 42) demostrando que el uso del caldo neutralizante ofreció resultados más precisos y exactos obteniendo resultados dentro de las especificaciones farmacopeicas, concluyendo que el método de inoculación fue apto para los análisis de recuento y microorganismos específicos.

4.3. Bases legales

4.3.1. Normatividad internacional

USP <61> Examen microbiológico de productos no estériles pruebas de recuento microbiano

En este capítulo de la farmacopea de los Estados Unidos se describen las pruebas que permiten el recuento cuantitativo de bacterias mesófilas y hongos que pueden desarrollarse en condiciones aeróbicas. Las pruebas están diseñadas principalmente para determinar si una sustancia o preparación cumple con una especificación establecida para la calidad microbiológica. (USP, Capítulo <61>, 2023)

USP <62> Examen microbiológico de productos no estériles pruebas de microorganismos específicos

En este capítulo de la USP se describen las pruebas que permiten determinar la ausencia o presencia limitada de microorganismos específicos que puedan ser afectados en condiciones determinadas (USP, Capítulo <62>, 2023).

USP <1111> Examen microbiológico de productos no estériles: criterios de aceptación de preparados y sustancias farmacéuticas para uso farmacéutico

Este capítulo de la farmacopea establece los criterios de aceptación para productos farmacéuticos no estériles basados en el recuento microbiano aeróbico total (TAMC) y el recuento total combinado de levaduras y mohos (TYMC) los cuales se proporcionan en el Anexo 1. Dichos criterios se basan en resultados individuales o en el promedio de recuentos repetidos cuando se realizan recuentos repetidos (p. ej., métodos directos en placa) (USP, Capítulo <1111>, 2023).

USP <1226> Verificación de procedimientos farmacopeicos

La intención de este capítulo es proporcionar información general sobre la verificación de los procedimientos compendiales que se realizan por primera vez para obtener

resultados aceptables utilizando el personal, el equipo y los reactivos disponibles. La verificación consiste en evaluar características de rendimiento analítico seleccionadas, como las que se describen en el capítulo, para generar datos apropiados y relevantes en lugar de repetir el proceso de validación (USP, Capítulo <1226>, 2023).

USP <1231> Análisis microbiológico del agua farmacéutica

Es de suma importancia que los sistemas de agua farmacéutica se mantengan adecuadamente para producir agua de alta calidad. Este capítulo proporciona información detallada sobre casi todos los aspectos del mantenimiento, la calificación y el control de un sistema de agua farmacéutica. El control microbiano es indiscutiblemente el aspecto más desafiante de operar un sistema de agua farmacéutico, ya que el agua se utiliza como materia prima, ingrediente y solvente en el procesamiento, formulación y fabricación de productos farmacéuticos (USP, Capítulo <1231>, 2023).

Informe N° 44, Anexo 1 de la Serie de Informes Técnicos de la OMS N° 957 elaborada por el Comité de expertos en Control de Calidad de Productos Farmacéuticos.

La Serie de Informes Técnicos de la OMS contiene las observaciones de diversos grupos internacionales de expertos que asesoran a este organismo, proporcionándole la información técnica y científica más reciente sobre una amplia gama de problemas médicos y de salud pública. Este apartado establece las buenas prácticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos.

ISO 9001:2015

La ISO 9001 es la norma de gestión de la calidad más utilizada a nivel internacional, y proporciona un marco y un conjunto de principios para la gestión de las organizaciones. La

certificación según esta norma ayuda a su empresa a lograr la satisfacción de los clientes y las partes interesadas

ISO 11133:2014

Esta norma se basa en el control de calidad de los medios de cultivo, además de especificar prácticas de preparación, producción y conservación. Cualquier medio, sea sólido o líquido debe ser adecuado, consistente y reproducible. Al realizar la promoción de crecimiento de cada lote de medio elaborado, se demuestra el rendimiento del mismo, respecto a un conjunto de criterios reconocidos internacionalmente y de este modo, los laboratorios pueden realizar evaluaciones microbiológicas fiables. Este nuevo estándar es normativo y por lo tanto obligatorio.

4.3.2. Normatividad nacional

Ministerio de Salud y Protección Social. Decreto 1156 de 2018

En este decreto se reglamenta el régimen de registro sanitario de productos fitoterapéuticos y se dictan otras disposiciones; además regula la fabricación y comercialización de medicamentos y productos fitoterapéuticos, fijando los parámetros y acciones para obtener dicho registro.

Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución número 5107 de 2005

En esta resolución se adopta el instrumento de verificación de cumplimiento de condiciones sanitarias para los laboratorios que elaboren productos fitoterapéuticos.

Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución número 3028 de 2008

Por la cual se definen las áreas técnicas de producción de los establecimientos farmacéuticos y aplica a todos aquellos fabricantes de medicamentos, nacionales o extranjeros, cuyos productos vayan a ser comercializados en el territorio colombiano.

Ministerio De Salud Y Protección Social. Resolución 1160 del 2016.

Por la cual se establece El Manual de Las Buenas Prácticas de Laboratorio de Manufactura Microbiológico para Medicamentos. Además, esta resolución establece que se debe realizar la aptitud de los métodos.

Ministerio De Salud Y Protección Social. Resolución 3619 del 2013.

Por la cual se expide el Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos.

5. METODOLOGÍA

La Valeriana solución oral x 60 ml es uno de los productos con mayor producción y comercialización elaborado por LABFARVE, sin embargo, no cuenta con una verificación de la aptitud del método microbiológico, por ende, como se puede observar en la tabla 1 para el presente trabajo se escogieron tres lotes (al azar), como matriz de estudio del producto anteriormente mencionado.

Tabla 1. *Matriz de estudio*

Nombre	Presentación	Lote
Valeriana solución oral	60 ml	2865072
	60 ml	2870092
	60 ml	3077122

Fuente: Autor (2023).

Consecuentemente, la Valeriana solución oral es un Fitoterapéutico que para poder ser comercializado debe cumplir con unas especificaciones microbiológicas, las cuales están dadas por la WHO (2007) que contemplen el recuento de microorganismos como: Aerobio mesófilos, mohos y levaduras, enterobacterias, así como, la presencia / ausencia de microorganismos específicos como es el caso de: *Salmonella* y *Escherichia coli* (Tabla 2). Aunque la USP solo especifique la ausencia de *Escherichia coli* para productos orales (como se puede observar en el anexo 1), LABFARVE en los requisitos microbiológicos se guía por la WHO ya que contempla específicamente contaminantes microbiológicos en material herbal; estando de este modo, más orientada a productos fitoterapéuticos como lo es la Valeriana Solución Oral.

Tabla 2. *Especificaciones microbiológicas para la Valeriana solución oral*

Análisis microbiológico	Especificación
Aerobios mesofilos (UFC/ml)	Max 10^5
Mohos y levaduras (UFC/ml)	Max 10^3
Enterobacterias (UFC/ml)	Max 10^3

<i>Salmonella</i>	Ausencia/ml
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia/10ml

Fuente: WHO (2007).

Al momento de realizar la aptitud del método se tuvo en cuenta que los equipos utilizados en el procedimiento (Tabla 3) tuvieran los certificados de calibración y calificación (tanto de desempeño como operacional) y que además siguieran vigentes, cumpliendo con el mantenimiento preventivo para equipos e instrumentos establecido por LABFARVE.

Tabla 3. Equipos utilizados

Equipo	Codigo	Fecha calibración/calificación	Cumple/no cumple
Nevera MELNG (Manejo de cepas)	844	04/08/2022	Cumple
Incubadora Binder (30 - 35°C)	681	29/11/2022	Cumple
Incubadora Binder (20 - 25°C)	429	29/11/2022	Cumple
Incubadora Binder (40 - 44 °C)	408	29/11/2022	Cumple
Balanza triple brazo (Preparación)	467	1/08/2022	Cumple
Balanza analítica	460	01/08/2022	Cumple
Autoclave JPInglobal	875	10/03/2023	Cumple
Cabina de bioseguridad	412	4/05/2022	Cumple
Cabina de flujo laminar	638	29/11/2022	Cumple
Microscopio			
Baño serológico (Cepas)	415	29/11/2022	Cumple
Baño serológico (Análisis de muestras)	634	29/11/2022	Cumple
Cuenta colonias (Incubación y lectura)	436	No aplica	No aplica
Micropipeta (Manejo de Cepas)	664	06/04/2022	Cumple
Micropipeta (Análisis de muestras)	234	08/06/2022	Cumple

Fuente: Autor (2023).

Asimismo, en la tabla 4 se observan los medios de cultivo que se utilizaron en este trabajo, los cuales además de estar vigentes, deben estar previamente aprobados, por ende se les realizó pruebas de promoción de crecimiento (Ver certificado de los medios en el anexo 2).

Tabla 4. *Medios de cultivo utilizados*

MEDIO	LOTE INTERNO	LOTE / FABRICANTE	FECHA DE VENCIMIENTO
Caldo Base Caseína Lecitina Polisorbato	001-280223	124792 / Sharlau	05/2025
Caldo Tripticasa de Soya	002-280223	VM987359 / Merck	30/08/2026
Caldo Rappaport- Vassiliadis	003-020323	109356 / Sharlau	08/2024
Caldo MacConkey	020-170223	127810 / Sharlau	09/2026
Agar TSA	006-020323-1	VM995858 / Merck	31/12/2026
Agar Sabouraud	022-020323-1	131882 / Sharlau	01/2026
Agar VRB - MUG	009-020323	VM1005730 / Merck	31/12/2023
Agar XLD	010-020323	130973 / Scharlau	12/2025
Agar MacConkey	021-010323	108520 / Scharlau	08/2024

Fuente: Autor (2023).

Por otro lado, en la tabla 5 se observan los reactivos utilizados en la identificación microscópica (Tinción de Gram y tinción de azul de lactofenol), con su respectivo lote y fecha de vencimiento.

Tabla 5. *Reactivos para identificación microscópica*

Reactivo	Lote	Fecha vencimiento
Reactivo de Gram Alcohol - Acetona	21096	30/03/2023
Lugol de Gram	21079	30/03/2023
Reactivo de Gram - Cristal Violeta	21074	26/06/2023
Fucsina de Gram	21104	03/2023
Azul de lactofenol	20479	30/03/2023

Fuente: Autor (2023).

Promoción de crecimiento de los medios de cultivo

La productividad de los medios se realizó de acuerdo a las especificaciones de la ISO 11133 DEL 2014, para cada uno de los medios de cultivos utilizados (Tabla 4) en el presente estudio. En el caso de los medios de cultivo sólidos, se inoculó en placas estériles una alícuota de no más de 100 UFC del microorganismo tanto para productividad como para selectividad. Para el caso de los medios de cultivo líquidos se inoculó de 10 – 100 UFC según el microorganismo que correspondía al medio de cultivo, se llevó a incubar por 72 horas y se verificó el crecimiento o inhibición de la cepa como se puede observar en la Tabla 6.

Tabla 6. Prueba de Promoción y crecimiento para los medios usados en la verificación

Prueba / Medio	Prueba	Cepas de Prueba	Criterio de aceptación
Recuento de aerobios mesófilos			
Agar Digerido de Caseína y Soja o Cadlo Digerido de Caseína y Soja 30 ° - 35° 18 - 24 horas	Productividad	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus brasiliensis</i>	Pr > 0.7 o Turbidez 2
Recuento de mohos y levaduras			
Agar Sabourad Dextrosa o Caldo Sabouraud Dextrosa 20° - 25° 5 días	<100 UFC	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus brasiliensis</i>	Pr>0.7
Prueba de Salmonella			
Caldo Rappaport Vaassiliadis / Agar Xilosa Lisina Desoxicolato	Productividad	<i>Salmonella Typhimurium</i>	Turbidez 2/ Pr >0.5
	Selectividad	<i>Staphylococcus aureus</i>	Turbidez 0 / Inhibición total
Prueba de Escherichia coli			
Caldo MacConkey / Agar MacConkey	Promoción del crecimiento	<i>Escherichia coli</i>	Turbidez 2/ Pr >0.5
	Prueba inhibitoria	<i>Staphylococcus aureus</i>	Turbidez 0 / Inhibición total

Nota. Pr: Porcentaje de recuperación. Fuente: Autor (2023).

Control de ambientes y superficies:

Se realizó el respectivo control microbiológico de ambientes y superficies a las áreas de: Análisis de muestras y Cepas. Para el cual se expusieron cajas de Petri de Agar Tripticasa (medios para aerobios mesofilos) de Soya y Sabouraud (mohos y levaduras) en el passtrought, la cabina y en el área. Los medios se dejaron un tiempo de cuatro horas y posteriormente se llevaron a incubar a 37°C por 3 días para el recuento de Aerobios Mesofilos y para el recuento de Mohos y Levaduras 5 días a temperatura 22°C. Transcurrido el tiempo se hizo el respectivo recuento (Anexos 5 y 6).

Preparación y estandarización del inóculo según Microbiologics (2021)

Se utilizaron las cepas microbianas sustentadas en la Tabla 7 y 8, conservadas en el Cepario del área de Microbiología de LABFARVE las cuales corresponden a microorganismos viables en cuarto pasaje según las recomendaciones de la USP (Ver certificado de las cepas de trabajo en el anexo 3).

A continuación, se describe la metodología para la reactivación de los microorganismos KWIK-STIK.

1. Se dejó la bolsa de KWIK-STIK sin abrir a temperatura ambiente.
2. Posteriormente, se abrió la bolsa rasgando a la altura de la muesca y se quitó la unidad de KWIK-STIK.
3. Luego se retiró la porción de la etiqueta y se colocó sobre la placa de cultivo principal. Teniendo cuidado de no desarmar el dispositivo durante la hidratación.
4. Seguidamente, sobre el borde de la mesa de trabajo se abrió la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK (justo debajo del menisco del líquido) con la finalidad de liberar el líquido hidratante.

5. Este se mantuvo de forma vertical y se golpeó suavemente sobre la superficie para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad que contiene el gránulo.
6. Inmediatamente se procedió a presionar la parte inferior de la unidad para que el gránulo se disolviera en el líquido hasta lograr una suspensión homogénea.
7. De inmediato, se saturó el hisopo con el material hidratado y se transfirió al medio con agar correspondiente (para aerobios mesófilos se realizó en Agar Tripticasa de Soya y para el caso de hongos y levaduras se hizo en Agar Sabouraud Dextrosa).
8. Se inoculó en la placa de cultivo principal, pasando el hisopo sobre un tercio de la placa. Utilizando un asa estéril, se realizó una siembra por estría o agotamiento, es decir sobre el tercio de la caja previamente inoculado se arrastró el asa en dos o tres secciones adicionales y de esta manera se redujo la población de microorganismos, lo cual facilita el aislamiento de la colonia, ya que permite obtener colonias separadas
9. Se descartó el KWIK-STIK de forma apropiada en desechos de riesgo biológico.
10. Finalmente, se incubaron las placas invertidas de cultivo principal inoculadas a temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo (Bacterias a 32°C durante 72 horas en Agar Tripticasa de Soya; Mohos y levaduras a 25°C durante 5-7 días en Agar Sabouraud Dextrosa).

Tabla 7. Cepas utilizadas para el método cuantitativo

CEPA	ATCC	LOTE	FECHA DE VENCIMIENTO
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	485-1024-2	30-06-2023

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	484-1386-5	31-05-2023
<i>Candida albicans</i>	10231	443-1258-6	30-04-2023
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	486-1219-4	31/05/2023
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	16404	392-1166-1	31-05-2023
<i>Fuente: Autor (2023)</i>			

Tabla 8. Cepas utilizadas para el método cualitativo (Ausencia/Presencia)

CEPA	ATCC	LOTE	FECHA DE VENCIMIENTO
<i>Escherichia coli</i>	8739	483-1134-5	31/05/2023
<i>Salmonella Tiphymurium</i>	14028	363-559-4	10/06/023
<i>Fuente: Autor (2023)</i>			

Preparación del inóculo:

Con un asa redonda estéril se tomó una muestra de la colonia del medio de cultivo previamente inoculado. Posteriormente, se realizó una suspensión del microorganismo en el interior del vial de ProtectTM, el cual es un sistema de criopreservación que sirve para almacenar los microorganismos a bajas temperaturas durante un largo tiempo, contiene una solución nutritiva con un componente crioprotector como el glicerol, el cual ayuda a prevenir el daño celular durante la congelación y descongelación. Se utilizó un cultivo fresco, es decir que tuviera de 18 a 24 horas de incubación para mesófilos y de 48 a 72 horas para hongos, con el fin de obtener mejores resultados. Luego, se cerró el vial y se mezcló por inversión 6 veces. Se procedió a dejarlo en posición vertical durante 30 segundos. Posteriormente, se promedió a retirar la mayor cantidad de líquido (Glicerol) posible utilizando una micropipeta. Se cerró el vial y finalmente se escribieron los datos necesarios en él. Una vez rotulado, el vial se dejó de forma horizontal en el congelador durante los primeros minutos con el objetivo de que la remoción de las perlas individuales sea más fácil y posteriormente se almacenó en un congelador a -20°C (Ver figura 1).

Figura 1. Preparación del cultivo (Microbiologics, 2021).



Se retiró el vial Protect™ del congelador y se procedió a usar un criobloque que fue almacenado en un congelador durante treinta minutos para extender el tiempo disponible para trabajar con el vial congelado. Se procedió a retirar una perla con un asa recta (introduciéndola en el orificio de la perla), como se observa en la figura 2. Seguidamente, se sembró de forma directa en el medio de cultivo y se incubó.

Figura 2. Recuperación del cultivo (Microbiologics, 2021).



Una vez pasado el tiempo de incubación, se procedió a tomar la mayor cantidad del microorganismo y se disolvió en 10 ml de solución salina al 0,8%, se agitó en un vortex durante 10 o 15 segundos y se hizo una comparación visual, hasta observar que la transparencia del líquido se redujo, evidenciando turbiedad en el medio. Una vez ya

estandarizado el inóculo mediante turbidimetría, se procedió a realizar las diluciones correspondientes en 10 ml de solución salina, las cuales van desde 10^{-1} hasta 10^{-7} con la finalidad de buscar un límite cuantificable para cada cepa, las cuales se sembraron por profundidad en Agar Tripticasa de Soya para aerobios mesófilos y Agar Sabouraud para mohos y levaduras. Seguidamente se llevó a incubar a las temperaturas correspondientes para cada grupo de microorganismos (20-25°C para mohos y levaduras y 30 – 35 °C para aerobios mesófilos).

5.1. Aptitud del método para aerobios mesofilos y Mohos y levaduras según USP

<61> en presencia y ausencia de Valeriana solución oral x60ml

5.1.1. Aptitud del método para aerobios mesofilos en ausencia de Valeriana solución oral

Se sembró por triplicado 0,1 ml de la suspensión de cada cepa de aerobios mesofilos previamente reactivada: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* a una concentración de 10 a 100UFC en Cajas de Petri; se vertió Agar Tripticasa de Soya y se llevó a incubar a 30-35 °C durante 3. Adicionalmente, se realizó por duplicado un control negativo que solo contenía Agar TSA. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de las unidades formadoras de colonias de cada microorganismo y se hizo coloración de Gram.

5.1.2. Aptitud del método para aerobios mesofilos en presencia de Valeriana solución oral

Se tomaron 10 ml de Valeriana solución oral y se agregaron a 90 ml de Caldo Caseína Lecitina Polisorbato, el cual además de actuar como diluyente, actúa como agente neutralizante de la actividad antimicrobiana que pueda contener el producto (Ver anexo 4:

neutralizantes comunes aceptados por la USP). De esta dilución se tomó 1ml y se sembró por profundidad, adicionalmente se agregó 0,1 ml de la suspensión de cada cepa de aerobios mesofilos previamente reactivada: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* en Cajas de Petri, esto se realizó por triplicado para cada microorganismo prueba; se vertió Agar Tripticasa de Soya y se llevó a incubar a 30-35 °C durante 3 o 4 días. Adicionalmente, se realizó por duplicado un control negativo que solo contenía 1ml del diluyente. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de las unidades formadoras de colonias de cada microorganismo y se hizo coloración de Gram.

5.1.3. Aptitud del método para mohos y levaduras en ausencia de Valeriana solución oral

Se sembró por triplicado 0,1 ml de la suspensión de cada cepa de mohos y levaduras previamente reactivada: *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* en Cajas de Petri; se vertió Agar Sabouraud y se llevó a incubar a 30-35 °C durante 3 o 4 días. Adicionalmente, se realizó por duplicado un control negativo que solo contenía Agar Sabouraud. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de las unidades formadoras de colonias de cada microorganismo y se hizo coloración de Gram.

5.1.4. Aptitud del método para mohos y levaduras en presencia de Valeriana solución oral

De la dilución preparada (Producto + Caldo CLP) se tomó 1 ml y se sembró por profundidad, adicionalmente se agregó 0,1 ml de la suspensión de cada cepa de mohos y levaduras previamente reactivada *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis* en Cajas de Petri, esto se realizó por triplicado para cada microorganismo prueba; se vertió Agar Sabouraud y se llevó a incubar a 20-25 °C durante 5 a 7 días. Adicionalmente, se realizó por

duplicado un control negativo que solo contenía 1ml del diluyente Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de las unidades formadoras de colonias y se hizo tinción con azul de lactofenol para *Apergillus brasiliensis* y con cristal violeta para *Candida albicans*

5.2. Aptitud del método para microorganismos específicos según USP <62>

5.2.1. Aptitud del método para microorganismos específicos en presencia de Valeriana solución oral

Para la identificación de *E. coli*: De la dilución preparada se tomó 1mL y se transfirieron a 100mL de caldo TSB y 0.1 ml de la cepa *Escherichia coli* ATCC 8739 el cual se llevó a incubación por 24 horas a 32°C. Se extrajo 1 ml del TSB descrito anteriormente y se inoculó en 100 ml de Caldo MacConkey, luego se incubó a 42-44°C por 24 horas. A continuación, con un asa se sembró en una placa con Agar MacConkey y se incubó de 30-35°C por 24 horas. Luego se hizo tinción de Gram

Para la identificación de *S. typhimurium*: se pasó 1mL del diluyente y 0.1mL de la cepa *Salmonella* a un frasco con 100mL de TSB y se llevo a incubar por 24 horas a 32°C. Transcurrido el tiempo se inoculó 0.1 ml en un tubo con 10 ml del Caldo Rappaport-Vassiliadis a una temperatura de 30-35°C por un periodo de 24 horas. Finalmente, con un asa estéril, se sembró por aislamiento en una placa con Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) y se incubó de 30-35°C durante 24 horas. Luego se hizo tinción de Gram.

5.2.2. Aptitud del método para microorganismos específicos en ausencia de Valeriana solución oral específicos según USP 62

En 100ml de caldo TSB se agregó 0.1mL de la dilucion de la Cepa de *Escherichia coli* ATCC el cual se llevó a incubación por 24 horas a 32°C. Se extrajo 1 ml del TSB descrito anteriormente y se inoculó en 100 ml de Caldo MacConkey, luego se incubó a 42-

44°C por 24 horas. A continuación, con un asa se sembró en una placa con Agar MacConkey y se incubó de 30-35°C por 24 horas. Luego se hizo tinción de Gram.

En 100ml de caldo TSB se agregó 0.1mL de la dilución de la Cepa de *Salmonella* ATCC y se llevó a incubar por 24 horas a 32°C. Transcurrido el tiempo se inoculó 0.1 ml en un tubo con 10 ml del Caldo Rappaport-Vassiliadis a una temperatura de 30-35°C por un periodo de 24 horas. Finalmente, con un asa esteril, se sembró por aislamiento en una placa con Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) y se incubó de 30-35°C durante 24 horas. Luego se hizo tinción de gram.

5.3. Análisis de rutina interno del producto Valeriana solución oral

5.3.1. Recuento de aerobios mesofilos; mohos y levaduras

Se tomaron 10 ml de Valeriana solución oral y se agregaron a 90 ml de Caldo Caseína Lecitina Polisorbato con el fin de mantener la proporción 1:10. De esta preparación se tomó 1ml y se transfirió a una caja de Petri vacía para el recuento por profundidad, luego se vertió agar Triplicasa de Soya, agar Sabouraud y agar VRB (Violeta cristal-Rojo neutro-Bilis-Lactosa)-MUG, para la determinación de aerobios-mesófilos, mohos, levaduras, coliformes totales y fecales, respectivamente. Posteriormente, se llevó a incubar en condiciones adecuadas: Agar Tripticasa de Soya a 32°C durante 72 horas, AGAR VRBA MUG a 32°C durante 48 horas y Agar Sabouraud a 25°C durante 5-7 días. Una vez transcurrido el periodo de incubación se realizó el conteo de las colonias obtenidas.

5.3.2. Recuento de microorganismos específicos: *Escherichia coli*

De la dilución preparada anteriormente se transfirió 1ml a 100mL de caldo TSB, se mezcló y se llevó a incubar a 35°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se tomó 1 ml de caldo TSB y se agregó a 100ml de Caldo MacConkey y se incubó a 42°C por

24 horas. Luego, se subcultivó en Agar MacConckey por 24 horas y se hizo la lectura de las cajas.

5.3.3. Recuento de microorganismos específicos: *Salmonella* Thiphymurium

De la dilución preparada anteriormente se transfirió 1ml a 100mL de caldo TSB, se mezcló y se llevó a incubar a 35°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se tomó 0.1 ml de caldo TSB y se agregó a 10 ml de Caldo Rappaport-Vassiliadis, para enriquecimiento de *Salmonella* y se incubó a 35°C por 24 horas. Luego, se subcultivo en Agar XLD el cual es un medio solido selectivo, permitiendo que se restrinja aún más, el crecimiento de la biota acompañante competitiva y se estimula el crecimiento de los microorganismos específicos, se llevó a incubar a 32°C por 24 horas y se hizo la lectura de las cajas.

5.4. Verificación del método microbiológico

Para llevar a cabo la verificación del método, se evaluó el parámetro de la exactitud, cual se evaluó una vez obtenido el promedio del recuento en ausencia y presencia del producto para cada lote de Valeriana. El valor de la exactitud es el promedio del porcentaje de recuperación en cada lote evaluado.

Con los recuentos obtenidos se aplicó la siguiente fórmula, para evaluar el porcentaje de recuperación de cada microorganismo:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\bar{X} \text{ DEL RECuento EN PRESENCIA DE LA MUESTRA}}{\bar{X} \text{ DEL RECuento EN AUSENCIA DE LA MUESTRA}} * 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de recuperación

Dicho valor debe ser menor al 50% y no exceder el 200% de recuperación de los microorganismos que fueron analizados (USP, 2023).

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD / SEMANA	FEBRERO				MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
INICIO DE LA PASANTIA																			
INDUCCIÓN																			
ELECCIÓN DE LA MATRIZ DE ESTUDIO																			
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA																			
ELABORACIÓN DE ANTEPROYECTO																			
ENTREGA PRIMER AVANCE																			
REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS DE TRABAJO																			
PREPARACIÓN DEL INOCULO																			
VERIFICACIÓN DEL METODO																			
ENTREGA SEGUNDO AVANCE																			
ANÁLISIS ESTADÍSTICO																			
ELABORACIÓN INFORME FINAL																			
PRESENTACIÓN DEL INFORME FINAL																			
SUSTENTACIÓN																			

7. RESULTADOS Y ANALISIS

Para llevar a cabo la verificación de la aptitud del método para el producto terminado Valeriana solución oral, a cada medio de cultivo empleado se le realizó una prueba de esterilidad, así como su respectiva promoción de crecimiento, para la cual los resultados fueron conformes dado que como se puede observar en la tabla 9 no hay una reducción del crecimiento mayor a 2, tal como lo estipula la USP 61, lo que demostró que los medios involucrados en la aptitud se encontraban en óptimas condiciones y eran capaces de recuperar los microorganismos evaluados

Tabla 9. Control microbiológico de los medios de cultivo empleados en el análisis microbiológico del producto Valeriana solución oral

Medios de cultivo	Promoción / Prueba inhibitoria	Microorganismo	Medio de referencia ⁹ (UFC/ml)	No. UFC / Turbidez	Pr/Turbidez
Caldo Tripticasa de Soya	Promoción de crecimiento	<i>Staphylococcus aureus</i>	15x10 x10 ⁻⁶	Turbidez 2	Turbidez 2
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13 x10 ⁻⁶	Turbidez 2	Turbidez 2
		<i>Bacillus subtilis</i>	18 x10 ⁻⁶	Turbidez 2	Turbidez 2
		<i>Candia albicans</i>	24 x10 ⁻⁶	Turbidez 2	Turbidez 2
		<i>Aspergillus brasiliensis</i>	8 x10 ⁻⁶	Turbidez 2	Turbidez 2
Agar Tripticasa de Soya	Promoción de crecimiento	<i>Staphylococcus aureus</i>	15x10 x10 ⁻⁶	16 x10 ⁻⁶	1,06
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13 x10 ⁻⁶	13 x10 ⁻⁶	1
		<i>Bacillus subtilis</i>	18 x10 ⁻⁶	17 x10 ⁻⁶	0,94
		<i>Candia albicans</i>	24 x10 ⁻⁶	22 x10 ⁻⁶	0,91
		<i>Aspergillus brasiliensis</i>	8 x10 ⁻⁶	7 x10 ⁻⁶	0,87
Agar Sabouraud	Promoción de crecimiento	<i>Candia albicans</i>	24 x10 ⁻⁶	23 x10 ⁻⁶	0,95
		<i>Aspergillus brasiliensis</i>	8 x10 ⁻⁶	8 x10 ⁻⁶	1

Agar VRB – MUG	Promoción de crecimiento	<i>Escherichia coli</i>	25 x10 ⁻⁶	23 x10 ⁻⁶	0,92
	Prueba inhibitoria	<i>Staphylococcus aureus</i>	15 x10 ⁻⁶	Inhibición total	N/A
Caldo Rappaport Vassiliadis	Promoción de crecimiento	<i>Salmonella Typhimurium</i>	23 x10 ⁻⁶	Turbidez 2	Turbidez 2
	Prueba inhibitoria	<i>Stapgylococcus aureus</i>	15 x10 ⁻⁶	Inhibición total	N/A
Agar XLD	Promoción de crecimiento	<i>Salmonella Typhimurium</i>	23 x10 ⁻⁶	20 x10 ⁻⁶	0,86
	Prueba inhibitoria	<i>Stapgylococcus aureus</i>	15 x10 ⁻⁶	Inhibición total	N/A
Caldo MacConkey	Promoción de crecimiento	<i>Escherichia coli</i>	25 x10 ⁻⁶	Turbidez 2	Turbidez 2
	Prueba inhibitoria	<i>Stapgylococcus aureus</i>	15 x10 ⁻⁶	Inhibición total	N/A
Agar MacConkey	Promoción de crecimiento	<i>Escherichia coli</i>	25 x10 ⁻⁶	21 x10 ⁻⁶	0.84
	Prueba inhibitoria	<i>Stapgylococcus aureus</i>	15 x10 ⁻⁶	Inhibición total	N/A

Fuente: Autor (2023).

Por otro lado, al momento de realizar la estandarización de las cepas a los microorganismos evaluados, se obtuvo la respectiva dilución de trabajo, la cual debe estar dentro del rango de 20 a 200 UFC/placa. Como se puede observar en la Tabla 10 dicha dilución para cada microorganismos es 10^{-6} excepto *Bacillus subtilis*, para el cual es de 10^{-5} .

Tabla 10. Resultado de la estandarización del inóculo

Repetición n	ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO														
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Candida albicans</i>			<i>Aspergillus brasiliensis</i>		
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
1	>300	28	0	242	35	0	35	0	0	45	10	0	47	11	1
2	>300	19	0	>300	38	0	31	0	0	32	12	0	53	11	3
3	>300	23	0	273	37	0	31	3	0	58	15	0	38	7	0
$\bar{x}$	>300	23	0	N/A	36	0	32	1	0	45	12	0	46	9	1

Fuente: Autor (2023).

7.1. Aptitud del método para aerobios mesófilos, mohos y levaduras en presencia de

Valeriana solución oral

Al realizar el recuento de aerobios mesófilos en presencia del producto + cepa se obtuvieron los resultados contemplados en la Tabla 11, como se puede observar hubo recuperación de todos los microorganismos en los tres lotes del producto analizados, lo que demuestra que el producto no inhibe el crecimiento bacteriano, ni de hongos con el método utilizado.

Tabla 11. Resultados para el recuento de aerobios mesófilos, mohos y levaduras en presencia del producto Valeriana solución oral

Microorganismo	<i>Pseudomona aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Candida albicans</i>			<i>Aspergillus brasiliensis</i>		
Lotes	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	x10 ⁻⁶ UFC/ml			x10 ⁻⁶ UFC/ml			x10 ⁻⁵ UFC/ml			x10 ⁻⁶ UFC/ml			x10 ⁻⁶ UFC/ml		
Caja 1	22	19	21	28	31	29	27	33	32	11	13	9	11	9	8
Caja 2	20	15	19	32	27	32	32	27	31	17	11	12	6	8	10
Caja 3	19	21	23	31	34	28	28	29	29	12	12	15	4	7	12
Promedio	20	18	21	30	30	32	29	29	30	13	14	12	7	7	10

Fuente: Autor (2023).

En cuanto al recuento de aerobios mesófilos en ausencia del producto se obtuvieron los resultados contemplados en la Tabla 12, como se puede observar hubo recuperación de todos los microorganismos.

Tabla 12. Resultados para el recuento de aerobios mesófilos, mohos y levaduras en ausencia del producto Valeriana solución oral

Microorganismo	<i>Pseudomona aeruginosa</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Candida albicans</i>			<i>Aspergillus brasiliensis</i>		
Lotes	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	x10 ⁻⁶ UFC/ml			x10 ⁻⁶ UFC/ml			x10 ⁻⁵ UFC/ml			x10 ⁻⁶ UFC/ml			x10 ⁻⁶ UFC/ml		
Caja 1	23	23	17	27	33	34	29	32	30	15	13	10	8	7	10
Caja 2	18	19	22	30	29	33	31	29	29	14	12	9	7	6	9
Caja 3	21	20	21	28	32	30	30	29	31	16	14	11	8	7	8
<u>X</u>	20	20	20	28	31	32	30	30	30	15	13	10	7	6	9

Fuente: Autor (2023).

7.2. Aptitud del método para microorganismos específicos en el producto Valeriana solución oral x 60 ml

En la tabla 13 se pueden apreciar los resultados obtenidos para el método de Ausencia/presencia de *Salmonella* Typhimurium (ATCC® 14028) en Agar XLD y los resultados obtenidos para el método de Ausencia/Presencia de *Escherichia coli* (ATCC® 8739) en Agar MacConkey, respectivamente, demuestran una recuperación del microorganismo lo cual permite demostrar que el método cumple satisfactoriamente con los parámetros requeridos para la verificación, cumpliendo con el concepto de recuperación y comprobando que la Valeriana solución oral no inhibe el crecimiento microbiano de estos dos patógenos.

Tabla 13. Detección de Presencia / Ausencia de microorganismos específicos en presencia y ausencia del Producto Valeriana solución oral.

Detección de microorganismos específicos					
Lote	Microorganismo	En presencia del producto	En ausencia del producto	Coloración de Gram	Prueba confirmatoria
2865072	<i>Salmonella</i> Typhimurim	Presencia	Presencia	Bacilo Gram negativo	Positiva
	<i>Escherichia coli</i>	Presencia	Presencia	Bacilo Gram negativo	Positiva
2870092	<i>Salmonella</i> Typhimurim	Presencia	Presencia	Bacilo Gram negativo	Positiva
	<i>Escherichia coli</i>	Presencia	Presencia	Bacilo Gram negativo	Positiva
3077122	<i>Salmonella</i> Typhimurim	Presencia	Presencia	Bacilo Gram negativo	Positiva
	<i>Escherichia coli</i>	Presencia	Presencia	Bacilo Gram negativo	Positiva

Fuente: Autor (2023).

En consecuencia, en agar MacConkey se observaron colonias de color rojo por la fermentación de la lactosa la cual baja el pH del medio precipitando las sales biliares, las cuales se identificaron por un halo rosado difuso alrededor de la colonia, al observar la

coloración de Gram (Anexo 7) se identificaron bacilos cortos Gram negativos, además se llevaron a cabo las respectivas pruebas bioquímicas (Anexo 8), estos resultados se compararon con la literatura garantizando la recuperación de *Escherichia coli* (Koneman et al, 2008; Pascual & Calderon 2000). En el agar XLD se observó el crecimiento de colonias negras debido a la producción de H₂S y al realizar la tinción de las colonias se observaron bacilos Gram negativos, las cuales son características de *Salmonella Typhimurium* que al ser comparadas con la literatura se corroboró la presencia del microorganismo en estudio

7.2.1. Análisis del producto

Como se puede observar en la tabla 14, al realizar el análisis de rutina interno para cada lote de Valeriana solución oral utilizado en este trabajo, se demostró que cumple con las especificaciones microbiológicas debido a que los recuentos están dentro del límite de aceptación para dicho producto.

Tabla 14. Análisis del producto Valeriana solución oral de los lotes 2865072, 2970092 y 3077122.

Producto		Valeriana solución oral x 60ml		
Lote		2865072	2970092	3077122
Ensayo	Especificación (WHO, 2007)	Resultado	Resultado	Resultado
Recuento de aerobios mesófilos	Máx. 100000	10	<10	30
		20	<10	20
		10	<10	20
Recuento de mohos y levaduras	Máx. 1000	<10	<10	<10
		<10	<10	<10
		<10	<10	<10
Coliformes fecales	Máx. 10	<10	<10	<10
		<10	<10	<10
		<10	<10	<10
Coliformes totales	<10	<10	<10	<10
		<10	<10	<10
		<10	<10	<10
Ausencia/1ml		Ausencia	Ausencia	Ausencia

<i>Salmonella</i> (presencia o ausencia /g)		Ausencia	Ausencia	Ausencia
		Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>E.coli</i> (presencia o ausencia /g)	Ausencia/10ml	Ausencia	Ausencia	Ausencia
		Ausencia	Ausencia	Ausencia
		Ausencia	Ausencia	Ausencia

Fuente: Autor (2023).

7.3. Verificación de la aptitud del método

En la tabla 15 se puede evidenciar que los valores de recuperación no fueron menores al 50% ni excedieron el 200% de recuperación de los microorganismos analizados, cumpliendo con las especificaciones de la <USP 61> vigente; comprobando que esta metodología es capaz de recuperar todos los microorganismos presentes en los productos. Así mismo, se observa que los resultados obtenidos presentan leves diferencias en el porcentaje de recuperación, demostrando que existe una estabilidad del crecimiento microbiano en el grupo con el microorganismo.

Tabla 15. Porcentaje de recuperación

Microorganismo	Lote	R.p.p (UFC/ml)	R,a,p (UFC/ml)	%Rec	Concepto
<i>Bacillus subtilis</i>	1	29x10 ⁻⁵	30 x10 ⁻⁵	96.67	Cumple
	2	29 x10 ⁻⁵	30 x10 ⁻⁵	96.67	Cumple
	3	30 x10 ⁻⁵	30 x10 ⁻⁵	100.00	Cumple
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	20 x10 ⁻⁶	20 x10 ⁻⁶	100.00	Cumple
	2	18 x10 ⁻⁶	20 x10 ⁻⁶	90.00	Cumple
	3	21 x10 ⁻⁶	20 x10 ⁻⁶	105.00	Cumple
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	30 x10 ⁻⁶	28 x10 ⁻⁶	107.14	Cumple
	2	30 x10 ⁻⁶	31 x10 ⁻⁶	96.77	Cumple
	3	32 x10 ⁻⁶	32 x10 ⁻⁶	100.00	Cumple
<i>Candida albicans</i>	1	13 x10 ⁻⁶	15 x10 ⁻⁶	86.67	Cumple
	2	14 x10 ⁻⁶	13 x10 ⁻⁶	107.69	Cumple
	3	12 x10 ⁻⁶	10 x10 ⁻⁶	120.00	Cumple
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1	7 x10 ⁻⁶	7 x10 ⁻⁶	100.00	Cumple
	2	7 x10 ⁻⁶	6 x10 ⁻⁶	116.67	Cumple
	3	10 x10 ⁻⁶	9 x10 ⁻⁶	111.11	Cumple

Nota: R.p.p: Recuento en presencia del producto. R.a.p: Recuento en ausencia del producto. %Rec: Porcentaje de recuperación microbiana. Fuente: Autor (2023).

Por otro lado, se puede deducir que es una metodología exacta, dado que el término "exactitud" cuando se aplica en microbiología en ensayos de recuento, es equivalente a la recuperación media (Cerde & Villarro, 2008). Además, el uso de cepas certificadas ATCC, otorga confiabilidad a los ensayos realizados debido a las características intrínsecas de las cepas, las cuales constan de bacterias patógenas y microorganismos ambientales que pueden afectar la integridad del producto, además, los resultados obtenidos demuestran que los microorganismos se pueden detectar en el producto lo que refuerza la idea de que un ensayo de verificación permite elucidar que los componentes de un producto farmacéutico pueden inhibir o favorecer el crecimiento bacteriano (Sueros, G. 2013). Además, también se puede observar que los porcentajes de recuperación obtenidos son similares en cada cepa para los 3 lotes de muestra que se utilizó en la verificación, por lo tanto, las suspensiones de trabajo resultantes de la estandarización de cepas han sido correctamente preparadas.

8. CONCLUSIONES

De acuerdo con el estudio realizado, se pudo demostrar mediante las pruebas de recuento en placa, que el método para el análisis microbiológico de aerobios mesófilos, mohos y levaduras para productos no estériles de la USP vigente, en ausencia y presencia del producto Valeriana Solución Oral, es apropiado para analizar el producto terminado.

Se logró recuperar adecuadamente *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli* en ausencia y presencia del producto evaluado, demostrando que este patógeno es capaz de crecer en el producto y que, además, la metodología usada en el análisis de rutina interno es la adecuada.

Se comprobó que las metodologías farmacopeicas aplicadas en el control de calidad de los productos no estériles en el laboratorio LABFARVE cumplen con los criterios establecidos en la USP, puesto que el porcentaje de recuperación para cada microorganismo específico fue satisfactorio, siendo mayor al 50% como lo exige la USP. Es decir, el análisis microbiológico de producto terminado es válido para realizar los análisis rutinarios de Valeriana solución oral x 60 ml debido a que cumple con los criterios de aceptación evaluados.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda verificar estas metodologías en todos los productos elaborados y comercializados por LABFARVE.

Evaluar la posibilidad de implementar el uso de métodos alternativos, los cuales son procedimientos más rápidos que los tradicionales al hacer uso de equipos o softwares para la gestión de los ensayos y análisis de datos; dado que los métodos tradicionales farmacopeicos, a pesar de poder desarrollarse en cualquier laboratorio de microbiología cuentan con la desventaja de tiempo, los tiempos de incubación pueden durar hasta ocho días retardando la liberación de los lotes y en la pronta implementación de medidas correctivas, repercutiendo en la rentabilidad de los productos.

Contar con todos los materiales y reactivos para poder llevar a cabo pruebas de bioquímicas necesaria para la identificación de microorganismos tanto al momento de realizar la promoción y crecimiento de los medios de cultivo, así como las validaciones a los productos o procedimientos y de este modo evitar enviar los microorganismos a un tercero cada que es necesario, disminuyendo así los costos y tiempo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aghili, S., Hossein A., Jabbari M., Abastabar M. (2016) Risk of Fungal Contamination of Ointments and Tablets after Opening of the Package for Use in Hospitals. Iran J Health Sci 4 (4) :1-13. URL: <http://jhs.mazums.ac.ir/article-1-455-en.html>
- Angerhofer, C. (2001). Toxicology and Clinical Pharmacology of Herbal Products By Melanie Johns Cupp (West Virginia University). Humana Press, Totowa, NJ. 2000. xxvi + 325 pp. 15 × 22.5 cm. \$79.50. ISBN 0-89603-791-6. Journal of Natural Products - J NAT PROD. 64. 845-845. 10.1021/np0007574.
- Arias, J., Ortiz, D., & González, A. (2013). Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado, elaborado en una industria farmacéutica. *Revista Cubana de Farmacia*, 47(2), 178-184. Recuperado en 01 de agosto de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152013000200005&lng=es&tlng=es.
- Avello, M, & Cisternas F. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista médica de Chile*, 138(10), 1288-1293. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872010001100014>
- Bent, S., Padula, A., Moore, D., Patterson, M., & Mehling, W. (2006). Valerian for sleep: a systematic review and meta-analysis. *The American journal of medicine*, 119(12), 1005–1012. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.02.026>
- Brochard, G., Le Bacle, C. (2009) Mycotoxines en milieu de travail. I. Origine et Propriétés Toxiques des Principales Mycotoxines. INRS, Documents pour le Médecin Du Travail. N. 119, p 299-302.

- Burguet, S. (2012). Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. *Revista CENIC, ciencias biológicas*, 43(3), 1 – 4
- Camaró, M., Martínez, R., Olmos, P., Catalá, V., Ocete, M., & Gimeno, C. (2015). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(7), e31–e36. doi:10.1016/j.eimc.2013.11.010
- Castillo, E. & Martinez, I. (2021) Manual de fitoterapia. (3 Edición., pp. 208) Editorial: Elsevier-Masson.
- Cerda J & Villarroel L. (2008). Evaluación de la concordancia interobservador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Rev Chil Pediatr.*, 79 (1): 54-58.
- Cerra, H., Fernández, M., Horak, C., Lagomarsino, M., Torno, G., Zarankin, E. (2013) Manual de Microbiología aplicada a las industrias Farmacéutica, Cosmética y de Productos Médicos. <http://repositorio.ub.edu.ar/handle/123456789/5137>
- Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., & Dhama, K. (2018). *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis*, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028>
- Daste, C. (2015) Control de calidad en la industria farmacéutica. [Tesis de pregrado, Pontificia Universidad católica del Ecuador] <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/8731/Control%20de%20Calidad%20en%20la%20Industria%20Farmac%C3%A9utica.pdf>

- Dietz, M., Mahady, G., Pauli, G & Farnsworth, N. (2005). Valerian extract and valerenic acid are partial agonists of the 5-HT_{5a} receptor in vitro. *Brain research. Molecular brain research*, 138(2), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.04.009>
- Dong, F, Wu, Z., Yang, L., Zi, C., Yang, D., Ma, R., Liu, Z., Luo, H., Zhou, J., & Hu, J. (2015). Iridoids and sesquiterpenoids of *Valeriana stenoptera* and their effects on NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Phytochemistry*, 118, 51–60.
doi:10.1016/j.phytochem.2015.08.015
- Fernández, S., Wasowski, C., Paladini, A., & Marder, M. (2004). Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 77(2), 399–404. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2003.12.003>
- Fresno, A & Accame, M (2001). *Valeriana officinalis*. Fitoquímica, farmacología y terapéutica. Vol. 15. Núm. 9. p 98-107
- González, Y., Oliveros, A., Cabrera, J., Cerra, J., & Díaz, F. (2022) Chapter 1 - A review of medicinal plants used as antimicrobials in Colombia. *Elsevier EBooks, Medicinal Plants as Anti-Infectives*. (Pages 3-57) <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90999-0.00005-7>.
- Götz, F., Bannerman, T., & Schleifer, K. (2006). The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, 5–75.
https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_1
- International Organization for Standardization (2014). ISO 11133:2014: Normas Obligatorias para los medios de cultivo.
- International Organization for Standardization (2015). ISO 9001:2015: Sistemas de gestión de la Calidad.

- Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G., Winn, W., Allen, S. & Janda, W. (2008). Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color. Panamericana. Buenos Aires, Argentina pp 1167
- Krull, R., Cordes, C., Horn, H., Kampen, I., Kwade, A., Neu, T. & Nörtemann, B. (2010). Morphology of filamentous fungi: linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger*. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 121, 1–21. https://doi.org/10.1007/10_2009_60
- Kutschker, A. (2011). Revisión del género Valeriana (Valerianaceae) en Sudamérica austral. *Gayana. Botánica*, 68(2), 244-296. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432011000200016>
- Labfarve. (2023). Nuestra Calidad. Labfarve <https://labfarve.com/pages/nuestra-calidad>
- Labfarve. (2023). Nuestra historia. Labfarve <https://labfarve.com/pages/nuestra-historia>
- Lopardo, H. (2016) Introducción a la microbiología clínica. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP)
- Marcucci, C., Relats, J., Bach, H., Kamecki, F., Varela, B., Wagner, M., ... Marder, M. (2020). Neurobehavioral evaluation and phytochemical characterization of a series of argentine valerian species. *Heliyon*, 6(12), e05691. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05691
- Medina, O., Sánchez, N., Fraguas, D., & Arango, C. (2008). Valeriana en el tratamiento a largo plazo del insomnio. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 37 (4), 614-626.
- Microbiologics (2021) Instrucciones de uso. Recuperado de: https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=530&c=915960&h=fe0261b9ecb4cb8f6a9c&_xt=.pdf

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (, 2019). Colombia, el segundo país más biodiverso del mundo, celebra el Día Mundial de la Biodiversidad. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. <https://www.minambiente.gov.co/bosques-biodiversidad-y-servicios-ecosistemas/colombia-el-segundo-pais-mas-biodiverso-del-mundo-celebra-el-dia-mundial-de-la-biodiversidad/>

Ministerio de Salud y Protección Social. Decreto 1156 del 2018. Por el cual se reglamenta el régimen de registro sanitario de productos fitoterapéuticos y se dictan otras disposiciones. 6 de Julio del 2018.

Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 1160 de 2016. Por la cual se establecen los Manuales de Buenas Prácticas de Manufactura y las Guías de Inspección de Laboratorios o Establecimientos de Producción de medicamentos, para la obtención del Certificado de Cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura. 6 de Abril de 2016.

Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 3028 de 2008. Por la cual se definen las áreas técnicas de producción de los establecimientos farmacéuticos y se establecen otras disposiciones. 13 de Agosto de 2008.

Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 3619 de 2013. Por la cual se expide el manual de buenas prácticas de laboratorio de control de calidad de productos farmacéuticos. 17 de septiembre de 2013.

Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 5107 de 2005 por la cual se adopta el Instrumento de Verificación de Cumplimiento de Condiciones Sanitarias para los Laboratorios que elaboren Productos Fitoterapéuticos. 29 de Diciembre de 2005.

Morales, M. (2018). Validación del Examen Microbiológico del Bicarbonato de Sodio y Sulfadiazina de plata según USP vigente. [Tesis de grado, Universidad Ricardo Palma].

https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14138/1697/Morales_m.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Navarro, C., Ortega, T., Garcia, D. (2008) Plantas medicinales para el insomnio. Centro de Investigación sobre fisioterapia. p. 37

Octavia, S., & Lan, R. (2014). The Family Enterobacteriaceae. The Prokaryotes, 225–286.
doi:10.1007/978-3-642-38922-1_167

OMS (2010). “Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos”, Informe N° 44, Anexo 1 de la Serie de Informes Técnicos de la OMS, No. 957, 2010 10.1021/np0007574

Padilla, J. (2007) Validación secundaria del método de recuento en placa en superficie de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos en un laboratorio de referencia [Trabajo de grado, Universidad Javeriana]
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8666/tesis15.pdf;jsessionid=6339A96AAF6530FD2C731413F23A2FCB?sequence=1>

Pasachova, J, Ramírez, S, & Muñoz, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova* , 17 (32), 25-38.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200025&lng=en&tlng=es.

Pascual, M. & Calderon, V., (2000) Microbiología Alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas. Díaz de Santos. Madrid, España

Perilla, L. (2013). Verificación de la aptitud de las pruebas de recuento microbiano y pruebas de microorganismos específicos para productos terminados elaborados en Anglopharma S.A.

[Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana]

<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/16188/1/PerillaJimenezLauraMargari>

Polka, J. & Silver, P. 2014. Induced sensitivity of *Bacillus subtilis* colony morphology to mechanical media compression. *Peer J*, 1 – 12.

Pretel, E. (2015). Evaluación de laboratorios de ensayo, ensayos de aptitud y materiales de referencia para el sector cosmético. Programa de calidad para el sector cosméticos.
<https://www.colombiaproductiva.com/CMSPages/GetFile.aspx?guid=2f17cc9b-78cc-40ec-9ce9-b9e7f22f4bb8>

Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 199. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>

Qvist, S. (2007). NordVal: A Nordic system for validation of alternative microbiological methods. *Food Control*, 18(2), 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.09.001>

Rao, V., Reddy, H., Raju, S., Chandra, J., Kavikishore, P., & Vijayalakshmi, M. (2008). Detection of indicator pathogens from pharmaceutical finished products and raw materials using multiplex PCR and comparison with conventional microbiological methods. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(9), 1007–1018.
<https://doi.org/10.1007/s10295-008-0376-z>

Rivadeneira, B. (2022) Verificación de la aptitud del método microbiológico para tres matrices farmacéuticas (sólida, semisólida y líquida) del laboratorio Neofarmaco del Ecuador Cía.

Ltda. [Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato]

<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/34992/1/CBT%20006.pdf>

Rondón, M., Velasco, J., Rojas, J., Gámez, L., León, G., Entralgo, E. & Morales,

A. (2018). Actividad antimicrobiana de cuatro especies de Valeriana (*Caprifoliaceae*) endémicas de los Andes venezolanos. *Revista de Biología Tropical*, 66 (3), 1282-1289. <https://dx.doi.org/10.15517/rbt.v66i3.30699>

Sandle, T. (2014). The Risk of *Bacillus cereus* to Pharmaceutical Manufacturing.

<https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/169507-The-Risk-of-em-Bacillus-cereus-em-to-Pharmaceutical-Manufacturing/>

Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. (Primera edición).

Smith, S., Seriki, A., & Ajayi, A. (2016). Typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* infections in Africa. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35, 1913-1922.

Southern African Development Community Accreditation Service. SADCAS. (2018). Criteria for

Validation and Quality Assurance in Microbiological Testing. Sadcas.org. <https://www.sadcas.org/criteria-validation-and-quality-assurance-microbiological-testing>

Sueros, G. (2013) Validación de un método de ensayo cuali-cuantitativo para el análisis microbiológico del jarabe Tyrex a nivel intralaboratorial [Tesis de grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos] <https://hdl.handle.net/20.500.12672/3430>

Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., & Škrlec, I. (2021).

Candida albicans - The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(2), 79. <https://doi.org/10.3390/jof7020079>

- The United States Pharmacopeial Convention. (2023). USP <1111>. Examen microbiológico de productos no estériles: criterios de aceptación para preparaciones farmacéuticas y sustancias de uso farmacéutico. USPNF 2023 Número 2.
<https://login.usp.org/cas/login?service=https%3A%2F%2Fonline.uspnf.com%2Fcas%2Flogin>
- The United States Pharmacopeial Convention. (2023). USP <61>. Examen microbiológico de productos no estériles: pruebas de recuento microbiano. USPNF 2023 Número 2.
<https://login.usp.org/cas/login?service=https%3A%2F%2Fonline.uspnf.com%2Fcas%2Flogin>
- The United States Pharmacopeial Convention. (2023). USP <62>. Examen microbiológico de productos no estériles: pruebas de microorganismos específicos. USPNF 2023 Número 2.
<https://login.usp.org/cas/login?service=https%3A%2F%2Fonline.uspnf.com%2Fcas%2Flogin>
- The United States Pharmacopeial Convention. (2023). USPNF 2023 Número 2.
<https://login.usp.org/cas/login?service=https%3A%2F%2Fonline.uspnf.com%2Fcas%2Flogin>
- Torres, I., Bento, E., Almeida, L. & Lima, E. (2012). Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of liposomal ceftazidime and cefepime against *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 43(3), 984–992. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120003000020>
- Vesth, T., Nybo, J., Theobald, S., Frisvad, J., Larsen, T., Nielsen, K. & Andersen, M. (2018). Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing of *Aspergillus* section Nigri. *Nature Genetics*. doi:10.1038/s41588-018-0246-1

WHO. World Health Organization (2007) Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. p.38

WHO. World Health Organization (2011) Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica. Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica