



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y**  
**BIOTECNOLOGÍA**



**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

---

**Tema:** Verificación de la aptitud del método microbiológico para tres matrices farmacéuticas (sólida, semisólida y líquida) del laboratorio Neofarmaco del Ecuador Cía. Ltda.

---

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, previa a la obtención del Título de Ingeniera en Biotecnología, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** Rivadeneira Cueva Brenda Patricia

**Tutor:** Dr. William Ricardo Calero Cáceres

Ambato – Ecuador

Marzo – 2022

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Dr. William Ricardo Calero Cáceres

### **CERTIFICA**

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autoriza la presentación de este Informe Final de Integración Curricular, modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de la Unidad de Integración Curricular de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 10 de Febrero del 2022

---

Dr. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 17143448859

**TUTOR**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Brenda Patricia Rivadeneira Cueva, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



---

Brenda Patricia Rivadeneira Cueva

C.I. 160056914-7

**AUTORA**

## **APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

**Presidente del Tribunal**

Dr. Mario Daniel García Solís, PhD

C.I. 110360547-1

Mg. Lorena de los Ángeles Núñez Villacís

C.I.180425690-5

Ambato, 09 de Marzo del 2022

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final de Integración Curricular o parte de él, como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, overlapping loops and lines, positioned above a horizontal line.

Brenda Patricia Rivadeneira Cueva

C.I. 160056914-7

**AUTORA**

## **DEDICATORIA**

*Este trabajo se lo dedico  
de todo corazón a mi  
familia, en especial  
a mi querida hija Oana  
que me ha dado todo su amor  
para culminar con éxito  
uno de mis proyectos.*

***Brenda Rivadeneira***

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por todas las oportunidades que me ha brindado en este tiempo, a mis padres y hermana por su apoyo incondicional. A mi pareja e hija por darme su amor y fuerzas para culminar con éxito este trabajo. Asimismo a mi tutor por su tiempo para revisar a detalle mis avances y a ayudarme hacer de esta tesis un trabajo de provecho.

También, extendo un agradecimiento fraterno al personal técnico – operativo que conforma la Empresa NEOFÁRMACO DEL ECUADOR Cía. Ltda., por abrirme las puertas de la institución y darme la oportunidad de realizar mi trabajo de titulación; de manera especial a Christian Dávila por sumergirme en el mundo de la Microbiología y siempre estar inculcándome más conocimientos. De igual forma a Carlitos Pazmiño por su ayuda a buscar nuevas estrategias y formas de ampliar el conocimiento y amar más la ciencia.

Gracias también a mi “Equipo dinamita” y mis “Joderes” por estar al pendiente de mis avances en la tesis y siempre estar ahí para cuando se les necesita.

**Brenda Rivadeneira**

## ÍNDICE GENERAL

<b>APROBACIÓN DEL TUTOR</b> .....	ii
<b>DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD</b> .....	iii
<b>APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO</b> .....	iv
<b>DERECHOS DE AUTOR</b> .....	v
<b>DEDICATORIA</b> .....	vi
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	vii
<b>RESUMEN</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	1
<b>1.1. Antecedentes Investigativos</b> .....	1
<b>1.1.1. Verificación de ensayos microbiológicos</b> .....	1
<b>1.1.2. Normativas Nacionales</b> .....	2
<b>1.1.3. Normativas Internacionales</b> .....	2
<b>1.1.4. Matrices Farmacéuticas</b> .....	6
<b>1.1.4.1. Matriz líquida (Gotas Pediátricas)</b> .....	6
<b>1.1.4.2. Matriz semisólida (Crema Vaginal)</b> .....	6
<b>1.1.4.3. Matriz sólida (Tabletas)</b> .....	6
<b>1.1.5. Cepas Certificadas</b> .....	6
<b>1.2. Objetivos</b> .....	10
<b>1.2.1. Objetivo General</b> .....	10
<b>1.2.2. Objetivos Específicos</b> .....	10
<b>CAPÍTULO II</b> .....	11
<b>METODOLOGÍA</b> .....	11
<b>2.1. Cepas de referencia</b> .....	11
<b>2.2. Materiales de Laboratorio</b> .....	11
<b>2.3. Equipos</b> .....	12
<b>2.4. Reactivos</b> .....	12
<b>2.5. Medios de cultivo</b> .....	13



2.6.	Matrices Farmacéuticas.....	13
2.7.	Métodos .....	14
2.8.	Hipótesis .....	14
2.8.1.	Hipótesis Nula.....	14
2.8.2.	Hipótesis Alternativa .....	14
2.9.	Activación de las cepas para la verificación del método .....	14
2.10.	Preparación de soluciones para verificación del método: .....	15
2.10.1.	Preparación del estándar McFarland .....	15
2.10.2.	Preparación del inóculo .....	16
2.10.3.	Preparación de Ácido Clorhídrico 1 mol/L .....	17
2.10.4.	Preparación de Hidróxido de Sodio 1 mol/L .....	17
2.10.5.	Preparación de medios de cultivo .....	17
2.10.6.	Condiciones de Incubación para los microorganismos.....	18
2.11.	Procedimiento de análisis microbiológico.....	20
2.11.1.	Matrices.....	20
2.11.2.	Preparación de la muestra para verificación.....	20
2.11.3.	Preparación de los controles .....	21
2.11.4.	Recuento de aerobios totales, mohos y levaduras por el método de vertido en placa .....	21
2.11.5.	Evaluación de ausencia/presencia de microorganismos específicos por el método de extensión en superficie .....	21
2.12.	Verificación del método microbiológico para el recuento de aerobios totales y mohos-levaduras para el recuento en placa .....	23
2.12.1.	Exactitud .....	23
2.12.2.	Precisión.....	23
2.12.3.	Robustez.....	24
2.13.	Verificación del método microbiológico para la determinación de presencia/ausencia de microorganismos específicos por el método de extensión en superficie .....	26
<b>CAPÍTULO III.....</b>		<b>28</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>28</b>
<b>CAPÍTULO IV .....</b>		<b>47</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>		<b>47</b>

<b>B. MATERIALES DE REFERENCIA.....</b>	<b>49</b>
<b>C. ANEXOS.....</b>	<b>52</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Recursos necesarios para la Verificación.....	<b>11</b>
<b>Tabla 2</b> Materiales de Laboratorio .....	<b>11</b>
<b>Tabla 3</b> Equipos de Laboratorio .....	<b>12</b>
<b>Tabla 4</b> Reactivos de Laboratorio .....	<b>12</b>
<b>Tabla 5</b> Medios de cultivo.....	<b>13</b>
<b>Tabla 6</b> Matrices Farmacéuticas.....	<b>13</b>
<b>Tabla 7</b> Condiciones de incubación para cada uno de los microorganismos .....	<b>18</b>
<b>Tabla 8</b> Factores a evaluar en el recuento de aerobios totales .....	<b>24</b>
<b>Tabla 9</b> Factores a evaluar en el recuento de mohos-levaduras .....	<b>24</b>
<b>Tabla 10</b> Resultados de la prueba de presencia/ausencia de microorganismos específicos .....	<b>29</b>
<b>Tabla 11</b> Datos primarios del recuento de aerobios totales – matriz líquida .....	<b>30</b>
<b>Tabla 12</b> Datos primarios del recuento de mohos-levaduras – matriz líquida .....	<b>30</b>
<b>Tabla 13</b> Resultados de exactitud y precisión para los recuentos de microorganismos en matriz líquida .....	<b>31</b>
<b>Tabla 14</b> Datos primarios del recuento de aerobios totales – matriz sólida.....	<b>31</b>
<b>Tabla 15</b> Datos primarios del recuento de mohos-levaduras – matriz sólida.....	<b>31</b>
<b>Tabla 16</b> Resultados de exactitud y precisión para los recuentos de microorganismos en matriz sólida.....	<b>31</b>
<b>Tabla 17</b> Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de <i>Aspergillus niger</i> por Tiempo de Incubación.....	<b>34</b>
<b>Tabla 18</b> Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de <i>Aspergillus niger</i> por Tipo de Placa .....	<b>35</b>

<b>Tabla 19</b> Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de Bacillus subtilis por Temperatura de Incubación .....	36
<b>Tabla 20</b> Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de B. subtilis por Tiempo de Incubación.....	38
<b>Tabla 21</b> Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de Bacillus subtilis por Tipo de Placa .....	38
<b>Tabla 22</b> Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de Aspergillus niger por Tiempo de Incubación.....	40
<b>Tabla 23</b> .....	41
<b>Tabla 24</b> Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de B. subtilis por Temperatura de Incubación.....	43
<b>Tabla 25</b> Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de B. subtilis por Tiempo de Incubación.....	44
<b>Tabla 26</b> Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de B. subtilis por Tipo de Placa	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Pruebas de recuento microbiano.....	4
<b>Figura 2</b> Pruebas de microorganismos específicos .....	5
<b>Figura 3</b> Etiquetado de criovial.....	15
<b>Figura 4</b> Diseño experimental para aerobios totales .....	25
<b>Figura 5</b> Diseño experimental para mohos-levaduras.....	26
<b>Figura 6</b> Comparación de dos muestras independientes .....	33
<b>Figura 7</b> Comparación de dos muestras independientes .....	34
<b>Figura 8</b> Comparación de dos muestras independientes .....	36
<b>Figura 9</b> Comparación de dos muestras independientes .....	37
<b>Figura 10</b> Comparación de dos muestras independientes .....	39
<b>Figura 11</b> Comparación de dos muestras independientes .....	41
<b>Figura 12</b> Comparación de dos muestras independientes .....	42
<b>Figura 13</b> Comparación de dos muestras independientes .....	44
<b>Figura 14</b> Comparación de dos muestras independientes .....	45

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Controles Negativos <i>P. aeruginosa</i> (Agar CE) y <i>S. aureus</i> (Agar Mannitol Salado).....	52
<b>Anexo 2:</b> Controles Positivos <i>P. aeruginosa</i> (Agar CE) y <i>S. aureus</i> (Agar Mannitol Salado).....	52
<b>Anexo 3:</b> Controles Negativos <i>S. enterica</i> (Agar XLD) y <i>E. coli</i> (Agar MacConkey) ..	52
<b>Anexo 4:</b> Controles Positivos <i>S. enterica</i> (Agar XLD) y <i>E. coli</i> (Agar MacConkey) ...	53
<b>Anexo 5:</b> Control Negativo de <i>C. albicans</i> .....	53
<b>Anexo 6:</b> Control Positivo de <i>C. albicans</i> .....	53
<b>Anexo 7:</b> Ensayos de presencia/ausencia de patógenos en Matriz Farmacéutica Líquida (Gotas Pediátricas) .....	53
<b>Anexo 8:</b> Ensayos de presencia/ausencia de patógenos en Matriz Farmacéutica Líquida (Tabletas Masticables) .....	54
<b>Anexo 9:</b> Ensayos de presencia/ausencia de patógenos en Matriz Farmacéutica Líquida (Crema Vaginal).....	55
<b>Anexo 10:</b> Recuento de mohos-levaduras a los 5 días de incubación matriz líquida .....	55
<b>Anexo 11:</b> Recuento de mohos-levaduras a los 7 días de incubación matriz líquida .....	55
<b>Anexo 12:</b> Recuento de mohos-levaduras a los 5 días de incubación matriz sólida.....	56
<b>Anexo 13:</b> Recuento de mohos-levaduras a los 7 días de incubación matriz sólida.....	56
<b>Anexo 14:</b> Recuento de mohos-levaduras matriz semisólida según tiempos de incubación .....	56
<b>Anexo 15:</b> Controles positivos para recuento de mohos-levaduras según tipo de placa	56
<b>Anexo 16:</b> Recuento de mohos-levaduras según el tipo de placa para matriz líquida ..	57
<b>Anexo 17:</b> Recuento de mohos-levaduras según el tipo de placa para matriz sólida .....	57
<b>Anexo 18:</b> Recuento de mohos-levaduras según el tipo de placa para matriz semisólida .....	57
<b>Anexo 19:</b> Recuento de aerobios totales control positivo .....	58
<b>Anexo 20:</b> Recuento de aerobios totales para matriz líquida .....	58
<b>Anexo 21:</b> Recuento de aerobios totales para matriz líquida .....	58

<b>Anexo 22:</b> Recuento de aerobios totales según el tipo de placa para matriz líquida.....	58
<b>Anexo 23:</b> Recuento de aerobios totales según el tipo de placa para matriz sólida .....	59
<b>Anexo 24:</b> Recuento de aerobios totales según el tipo de placa para matriz semisólida	59

## RESUMEN

El presente Informe Final de Integración Curricular describe la verificación de la aptitud del método microbiológico para productos no estériles, el mismo que incluye ensayos de presencia y ausencia de microorganismos específicos más comunes como: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*; y ensayos de recuento de aerobios totales (*Bacillus subtilis*) y mohos – levaduras (*Aspergillus niger*) con cepas ATCC certificadas. Los resultados de los análisis microbiológicos se evaluaron conforme a los criterios establecidos por la USP y AEFI para cada una de las tres matrices farmacéuticas: sólida (tabletas masticables), semisólida (crema vaginal) y líquida (gotas pediátricas). Para la verificación del método se evaluó bajo ciertos parámetros, en donde se demostró que éste es exacto ya que arrojó porcentajes superiores al 70 y que se encontraban dentro del rango establecido por la USP, no menor al 50 ni mayor al 200 por ciento de recuperación microbiana; preciso porque los datos resultaron inferiores al 20 por ciento y robusto. Además, en el ensayo de robustez se comparó factores como temperatura, tiempo de incubación y tipo de placa que pueden influir en el crecimiento de los microorganismos de recuento. De acuerdo con los resultados, se demostró que el método microbiológico verificado es confiable y apropiado para la determinación de microorganismos patógenos y el recuento de aerobios totales y mohos-levaduras en las tres matrices farmacéuticas del Laboratorio Neofarmaco del Ecuador Cía. Ltda.

**Palabras claves:** Industria farmacéutica, análisis microbiológico, matrices farmacéuticas, Laboratorio Neofarmaco.

## ABSTRACT

This degree project describes the verification of the suitability of the microbiological method for non-sterile products, which includes tests for the presence and absence of the most common specific microorganisms such as: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*; and total aerobic (*Bacillus subtilis*) and mold-yeast (*Aspergillus niger*) count tests with certified ATCC strains. The results of the microbiological analyzes were evaluated according to the criteria established by USP and AEFI for each of the three pharmaceutical matrices: solid (chewable tablets), semi-solid (vaginal cream) and liquid (pediatric drops). For the verification of the method, it was evaluated under certain parameters, where it is highlighted that it is exact since it yielded percentages greater than 70 and that it was found within the range established by the USP, not less than 50 nor greater than 200 percent of microbial recovery; accurate because the data was less than 20 percent and robust. In addition, in the robustness test, factors such as temperature, incubation time and type of plate that can influence the growth of the counting microorganisms were compared. According to the results, it is shown that the verified microbiological method is reliable and appropriate for the determination of pathogenic microorganisms and the count of total aerobes and molds-yeasts in the three pharmaceutical matrices of the Neofarmaco Laboratory of Ecuador Cía. Ltd.

**Keywords:** Pharmaceutical industry, microbiological analysis, pharmaceutical matrices, Neofarmaco Laboratory

## CAPÍTULO I.

### MARCO TEÓRICO

#### 1.1. Antecedentes Investigativos

##### 1.1.1. Verificación de ensayos microbiológicos

Se entiende por verificación de un método a los procesos que permiten conocer si los resultados que se han obtenido por el mismo son similares y tan eficaces como los alcanzados por los métodos de referencia (**Qvist, 2007**). Es por esta razón, que una verificación para cualquier industria farmacéutica representa un punto importante que debe ser cubierto, ya que ayuda a disminuir el riesgo de un análisis erróneo y a la vez incrementa la probabilidad de reducción de costos que resultan innecesarios para la empresa.

En los ensayos microbiológicos, es más común hallar variables en métodos de análisis porque el crecimiento de los microorganismos obedece a las características de la diversidad biológica que poseen todos los seres vivos. Por este motivo, la verificación de dichos ensayos debe abarcar absolutamente todos los aspectos que puedan causar alguna afectación en el crecimiento bacteriano (**Morales, 2018**). En este contexto, varias referencias internacionales, dentro de ellas, la USP y AEFI, permiten la evaluación de dichas características bajo los parámetros de exactitud, precisión y robustez; las cuales evalúan el crecimiento de los microorganismos respecto a un control, la manera en la que se mantienen en un determinado tiempo, y también determina que los resultados obtenidos permanezcan iguales durante un determinado periodo (**Perilla, 2013**).

Por otra parte, la ejecución de estos ensayos de verificación microbiológica termina siendo una competencia, no solo para las industrias farmacéuticas, sino también, para los entes reguladores como la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA), cuyos lineamientos van de la mano con los emitidos por organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Farmacopea de los Estados Unidos (USP). Tanto los organismos nacionales como



internacionales tienen como fin asegurar la calidad de los medicamentos fabricados y comercializados por una industria farmacéutica en el Ecuador (**OMS, 2013**).

### **1.1.2. Normativas Nacionales**

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) garantizan la calidad de los productos pasando desde la fabricación controlada hasta el cumplimiento de estándares de calidad y exigencias de comercialización (**Villacís, 2021**). El fin de las BPM es disminuir los riesgos que resultan inherentes en el proceso de producción de fármacos (**OMS, 2010**).

Dentro del marco regulatorio de las BPM en el Ecuador se encuentra la Dirección Ejecutiva de la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA), la misma que según el artículo 361 de la Constitución de la República del Ecuador emitida en el Registro Oficial 257 es la responsable de normar, regular y controlar todas aquellas actividades que guarden relación con la salud (**Agencia Nacional de Regulación Control y Vigilancia Sanitaria - ARCSA, 2018**).

Asimismo, según la Ley Orgánica de Salud en el Artículo 131, menciona que: “El cumplimiento de las normas de buenas prácticas de manufactura, almacenamiento, distribución, dispensación y farmacia, será controlado y certificado por la autoridad sanitaria nacional”, siendo el ARCSA el responsable de emitir dichas normativas en el país (**ARCSA, 2018**).

El Comité de Expertos en Especificaciones para las preparaciones Farmacéuticas de la Organización Mundial de la Salud, a través del Informe Técnico No. 37 (WHO Technical Report Series No. 908, Anexo 4) da a conocer ciertas guías de Buenas Prácticas de Manufactura para Productos Farmacéuticos (**ARCSA, 2018**).

### **1.1.3. Normativas Internacionales**

La OMS es el principal organismo que detalla la forma correcta de trabajo dentro de un laboratorio de microbiología de control de calidad para productos farmacéuticos dentro de la guía de Buenas Prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología

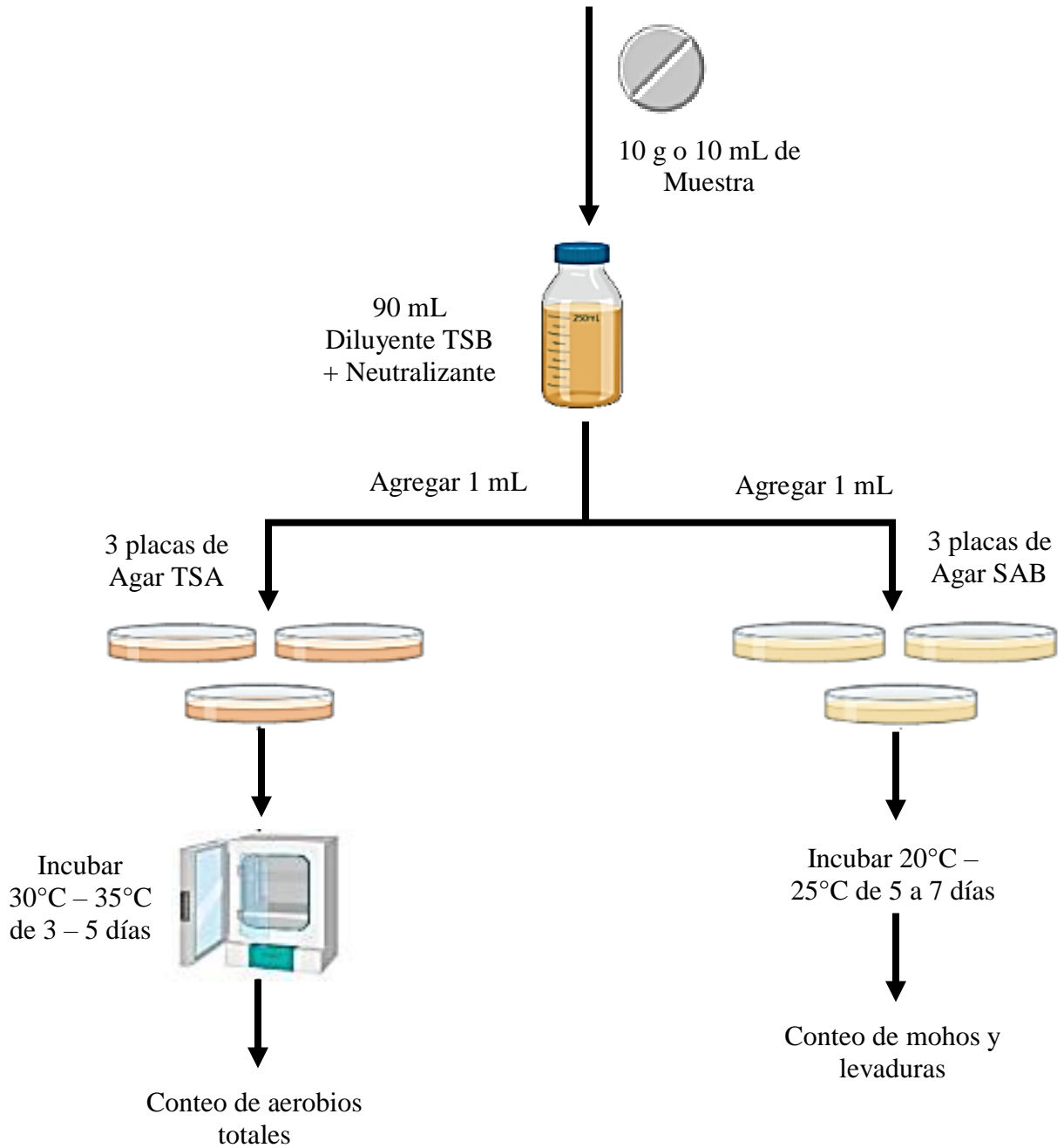
farmacéutica. Esta reitera cuán importante es que las Industrias Farmacéuticas garanticen la calidad de los productos, y de esta manera generen ensayos estandarizados y verificados por cada laboratorio. Dicho en otras palabras, cada producto que se elabore en un laboratorio farmacéutico debe tener su protocolo de validación o verificación que respalde que dicho producto permite la recuperación de los microorganismos de referencia **(OMS, 2013)**.

Asimismo, la OMS es quien le da la potestad al compendio USP para manejar y reportar tanto los ensayos microbiológicos estandarizados como las pruebas de verificación de los mismos. En el caso de ensayos microbiológicos para productos no estériles se pueden destacar dos pruebas reportadas en los capítulos de la USP <61> (Pruebas de recuento microbiano) y USP <62> (Pruebas de microorganismos específicos).

Las pruebas de recuento microbiano se basan en cuantificar aerobios mesófilos y mohos - levaduras que se han recuperado de un determinado producto farmacéutico no estéril **(USP, 2021a)** (Figura 1). Mientras que las pruebas de microorganismos específicos es para identificar la presencia/ausencia de ciertos microorganismos patógenos en matrices farmacéuticas **(USP, 2021b)** (Figura 2). Los microorganismos dependerán de cada matriz farmacéutica, es decir, en el caso de productos farmacéuticos con administración oral se debe demostrar la ausencia de *Escherichia coli* y *Salmonella entérica*, para medicamentos de uso tópico se comprueba la ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Existen otros casos especiales como son las cremas de uso vaginal en donde se recomienda también realizar un análisis de *Candida albicans*. Por estas razones, los microorganismos identificados van a depender del uso que se le proporcione a cada uno de los fármacos y también a la patogenicidad que tengan los mismos.

**Figura 1**

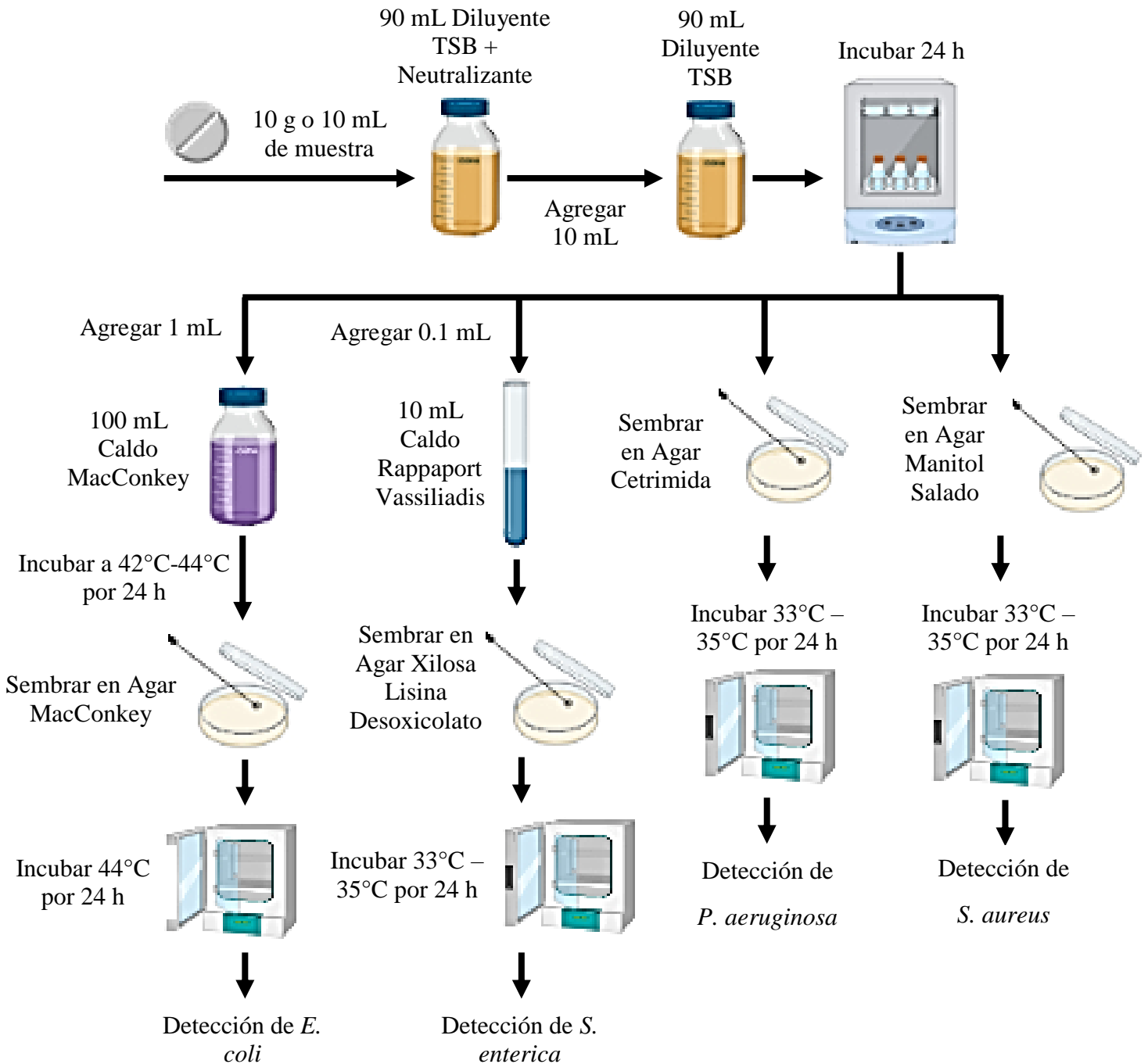
*Pruebas de recuento microbiano*



*Nota:* La figura demuestra el proceso general de cómo se realiza el recuento de aerobios totales y mohos levaduras basados en el capítulos de la USP <61>.

**Figura 2**

*Pruebas de microorganismos específicos*



*Nota:* La figura representa el proceso general de cómo se realiza las pruebas de presencia/ausencia de microorganismos patógenos basados en el capítulo de la USP <62>.

#### **1.1.4. Matrices Farmacéuticas**

##### **1.1.4.1. Matriz líquida (Gotas Pediátricas)**

Líquido homogéneo, libre de partículas extrañas, color amarillo, olor y sabor a naranja.

##### **1.1.4.2. Matriz semisólida (Crema Vaginal)**

Crema homogénea de color blanco.

##### **1.1.4.3. Matriz sólida (Tabletas)**

Tabletas masticables blancas y redondas.

#### **1.1.5. Cepas Certificadas**

Los microorganismos forman parte de la mayor cantidad de procesos industriales en donde se elaboran productos que durante su vida útil se van a encontrar en contacto directo, tanto con la parte externa como interna del organismo. En este sentido, es de vital importancia asegurarse que dichos productos estén libres de patógenos y posean un límite de microorganismos que no modifiquen de forma grave la microbiota normal del ser humano (**Abbasian, Ghafar, & Magierowski, 2018**); como es el caso de los medicamentos no estériles.

En la verificación de ensayos microbiológicos, se emplean cepas certificadas que permitan la identificación de un microorganismo en particular y, que también posean características análogas a las patógenas. Por esta razón, la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) recomienda el uso de cepas de referencia producidas por empresas extranjeras, así como la American Type Culture Collection (ATCC), ésta envuelve un sinnúmero de microorganismos que a diario son utilizados en las industrias farmacéuticas (**Morales, 2018**).

Dentro de un ensayo de verificación, es de suma importancia la robustez y especificidad de las cepas que se empleen, es por ello que el usar diferentes microorganismos permite obtener variabilidad en el ensayo y evaluar la forma en la que se comporta el producto respecto a dicha cepa (**Simbron de la Cruz &**

Ysuhuallas, 2020). Algunas de las cepas empleadas para la verificación en microbiología son:

1. Cepas para Recuento Microbiano:

- a. *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404: es un organismo eucariótico que produce conidios negros que pueden dispersarse con bastante facilidad en el ambiente. Se utiliza con frecuencia en las industrias de alimentos y fármacos para producir enzimas. Este microorganismo es el único modelo de hongo filamentoso empleado en este trabajo de titulación para la detección de contaminación por hongos en los productos gracias a su alto nivel de producción de metabolitos secundarios y su capacidad de degradación de compuestos químicos (Cerra et al., 2013)
- b. *Bacillus subtilis* ATCC 6633: es una bacteria gram positiva, que se encuentra comúnmente en el suelo. Es bastante usado en estudios de resistencia y contaminación ambiental como modelo biológico gracias a su tolerancia a condiciones adversas (presión, calor y salinidad) (Polka & Silver, 2014). Además, en la industria farmacéutica este microorganismo es empleado como agente de biocontrol de la contaminación ambiental (Yesid & Sánchez, 2012), es decir, muestra aquellas fallas que puedan existir en la infraestructura del área de producción o en las buenas prácticas de manufactura que maneja la industria farmacéutica para tomar acciones al respecto.

2. Cepas Patógenas:

- a. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538: son bacterias gram positivas que en su mayoría tienen forma de coco. Este microorganismo es muy común que se encuentre en los seres humanos, principalmente en la piel, pliegues inguinales, zona nasofaríngea y axilas (Hernández et al., 2005). Sin embargo, cuando entra en contacto con algunas capas mucosas puede ser altamente patógeno ocasionando así infecciones en piel o tejidos blandos. A esta bacteria dentro de un laboratorio se la puede identificar mediante pruebas de coagulasa, la cual a diferencia de las otras especies de

*Staphylococcus* es positiva, y también, por una prueba de catalasa, en donde este microorganismo generará oxígeno al ponerse en contacto con el peróxido de hidrógeno (Tong et al., 2015). Otra pruebas de identificación de esta bacteria es mediante diversos medios de cultivo, el primero Agar Baird Parker, las colonias de este microorganismo son de color negro por la reducción del telurito; y el segundo en Agar Manitol Salado, en donde las colonias son amarillas debido a la fermentación del manitol. Por otro lado, para conocer la capacidad del microorganismo de hidrolizar el ADN, se emplea el agar DNAsa porque la actividad desoxirribonucleasa es la que muestra el nivel de patogenicidad del mismo (Pasachova, Ramirez, & Muñoz, 2019). Para evitar el crecimiento de este microorganismo en los fármacos, 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 fármacos.

- b. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027: son microorganismos gram negativos cuyo crecimiento se da a temperaturas de 37°C - 42°C (Perilla, 2013). Es productor de ciertos pigmentos como pirocianina y la formación de biopelículas. Dentro de las industrias farmacéuticas la presencia de este microorganismo está distribuido y mantenido por el empleo de agua contaminada y la mala conservación de los fármacos con alto contenido de agua como por ejemplo: jarabes, cremas, gotas, entre otros (Tam, Wibowo, & Rehm, 2020). Este tipo de contaminación puede detectarse mediante el aislamiento en medios de cultivo selectivos o con el uso de técnicas moleculares.
- c. *Escherichia coli* ATCC 8739: es un bacilo gram negativo que se lo puede considerar como parte de la flora normal del ser humano, específicamente del intestino, ya que éste lo adquiere pocas horas después de su nacimiento. Su importancia en las industrias farmacéuticas se basa en el ciclo de vida de este microorganismo, debido a que su vía de infección es oral. El óptimo desarrollo de esta bacteria mesófila está basado en la temperatura corporal

de los animales de sangre caliente, la cual se encuentra entre los 35°C – 43°C (Perilla, 2013).

- d. ***Salmonella enterica* ATCC 14028:** son bacterias gram negativos que en la actualidad se emplea para estudios de resistencia antimicrobiana y genómica. Este tipo de microorganismo 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). Es por esta razón, que su identificación es primordial en fármacos que van a estar en contacto directos las fosas nasales o heridas abiertas.
- e. ***Candida albicans* ATCC 10231:** microorganismo gram positivo resistente a gran cantidad de fármacos y que presenta características estructuralmente similares con los hongos que se han desarrollado mediante producción de pseudohifas, estas pertenecen a un grupo de levaduras que resultan sumamente patógenas para cualquier organismo, especialmente en las partes donde se acumulan mucosas bucal y vaginal (Dadar et al., 2018). Por esto, las industrias farmacéuticas deben guardar un control estricto en cuanto a productos vaginales como óvulos o cremas.

Es importante considerar que los cultivos de trabajo no deben sobrepasar los cinco repiques o pasajes de la cepa de referencia original y estos cultivos deben ser subcultivos primarios de los stocks de referencia, las mismas que como se mencionó anteriormente deben ser almacenadas en alícuotas ya sea liofilizadas o congeladas (OMS, 2013).



## **1.2.Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo General**

Verificar la aptitud del método microbiológico para tres matrices farmacéuticas (sólida, semisólida y líquida) en el Laboratorio Neofármaco del Ecuador Cía. Ltda.

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

- Realizar el recuento microbiano de aerobios totales, mohos y levaduras para las tres matrices farmacéuticas.
- Efectuar la prueba de ausencia/presencia de microorganismos específicos para cada una de las matrices farmacéuticas.
- Evaluar la fiabilidad de los métodos microbiológicos proporcionados en el análisis de rutina interno.

## CAPÍTULO II

### METODOLOGÍA

#### 2. Materiales

##### 2.1. Cepas de referencia

**Tabla 1**

*Recursos necesarios para la Verificación*

<b>CEPAS ATCC</b>	<b># Ensayos</b>
<i>E. coli</i> ATCC 8739	30
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	30
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	30
<i>S. enterica</i> ATCC 14028	30
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	30
<i>A. brasillensis</i> ATCC 16404	30
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	30

##### 2.2. Materiales de Laboratorio

**Tabla 2**

*Materiales de Laboratorio*

<b>INSUMOS</b>	<b>Cantidad</b>
Traje Antifluidos	1 traje
Mandil	1 mandil
Guantes estériles	100 pares
Placas estériles	300 ud.
Cinta Parafilm	1 ud.
Asa de Platino Estéril	1 asa
Gradilla	1 gradilla
Pesamuestras (Aluminio)	1 ud.

<b>INSUMOS</b>	<b>Cantidad</b>
Puntas	300 ud.
Frascos Estériles	30 ud.

### 2.3. Equipos

**Tabla 3**

*Equipos de Laboratorio*

<b>EQUIPOS</b>	<b>Cantidad</b>
Autoclave	1
Baño María	1
Cabina de flujo laminar	1
Incubadoras	2
Refrigerador	1
Espectrofotómetro UV-VISIBLE	1
Ph-Metro	1
Tanque de Nitrógeno Líquido	2
Micropipeta Semiautomática	1
Vortex	1

### 2.4. Reactivos

**Tabla 4**

*Reactivos de Laboratorio*

<b>REACTIVOS</b>	<b>Cantidad</b>
Cloruro de bario dihidratado	0.117244g
Agua purificada	16400 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.01 ml
Solución Salina	500 ml
HCl	8.5 ml

<b>REACTIVOS</b>	<b>Cantidad</b>
Glicerol	5 ml
NaOH	4g

## 2.5. Medios de cultivo

**Tabla 5**

*Medios de cultivo*

<b>MEDIOS DE CULTIVO</b>	<b>#Ensayos</b>
Caldo Soja Tripticaseína (TSB)	140
Agar Soya Tripticasa (TSA)	30
Agar Saboroud Dextrosa (SAB)	30
Caldo Saboroud Dextrosa	30
Agar MacConkey (MK)	30
Caldo MacConkey	30
Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)	30
Caldo Rappaport-Vassiliadis	30
Agar Cetrimida (CE)	30
Agar Manitol Salado	30

## 2.6. Matrices Farmacéuticas

**Tabla 6**

*Matrices Farmacéuticas*

<b>MATRICES FARMACEÚTICAS</b>	<b>Cantidad</b>
Sólida (Tabletas Masticables)	17 Cajas (x 20 tabletas)
Líquida (Gotas Pediátricas)	27 Frascos

<b>MATRICES FARMACEÚTICAS</b>	<b>Cantidad</b>
Semi-sólida (Crema Vaginal)	12 Tubos

## **2.7. Métodos**

La metodología se basó en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), específicamente en los Capítulos 61 y 62, mientras que los criterios de verificación se tomaron del Libro de Validación de Métodos Analíticos de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI).

## **2.8. Hipótesis**

### **2.8.1. Hipótesis Nula**

Los métodos microbiológicos verificados garantizan la obtención de resultados precisos y exactos.

### **2.8.2. Hipótesis Alternativa**

Los métodos microbiológicos verificados no garantizan la obtención de resultados precisos y exactos.

## **2.9. Activación de las cepas para la verificación del método**

Las cepas que se emplearon fueron de tercer repique adquiridas del proveedor Microbiologics y correspondieron a los siguientes microorganismos:

- *S. aureus* ATCC 6538
- *P. aeruginosa* ATCC 9027
- *E. coli* ATCC 8739
- *S. enterica* ATCC 14028
- *C. albicans* ATCC 10231
- *A. brasiliensis* ATCC 16404
- *B. subtilis* ATCC 6633

Cada una de las ellas se activó de acuerdo al protocolo establecido y verificado por el proveedor de las cepas. Asimismo, una vez activadas, los crioviales que contenían la cepa fueron almacenados en tanques de nitrógeno líquido y etiquetados con la siguiente información:

- Identificación
- Tipo y número de colección (American Type Culture Collection)
- Número de repique
- Fecha de realización
- Fecha de vencimiento del criovial
- Número de criovial

Ejemplo:

### **Figura 3**

*Etiquetado de criovial*

<p><i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 Repique #2 FR: 20 Septiembre 2020 FV: 20 Septiembre 2025 (I-20)</p>
--

*Nota:* La figura muestra todos los detalles que debe comprender una etiqueta para cada uno de los crioviales.

## **2.10. Preparación de soluciones para verificación del método:**

### **2.10.1. Preparación del estándar McFarland**

Se preparó la solución de cloruro de bario a una concentración de 0.048M, mezclando 0.117244g de cloruro de bario dihidratado en 10 mL de agua purificada. Además, se preparó la solución de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.18M realizando una mezcla de 1.01 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 100 mL de agua purificada. Finalmente se mezcló 0.5 mL de la solución de cloruro de bario 0.048M con 99.5 mL de la solución preparada de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con el fin de obtener una densidad de

bacterias aproximada de  $1 \times 10^8$ . Y se verificó en el espectrofotómetro UV-VISIBLE a 625 nm que la absorbancia se encontraba en el rango de 0.08 a 0.1 (CDC & OMS, 2009).

### 2.10.2. Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se siguió el protocolo según la **Organización Internacional de Normalización - ISO (2015)**, en donde se tomó un criovial del tanque de nitrógeno líquido y se dejó acondicionar dentro de la cámara de flujo durante 30 minutos para luego ser incubada a 37°C de 18 a 24 horas. Con ayuda de un asa estéril se tomó una alícuota de 1µL (capacidad del asa de platino) y se inoculó en un medio de agar no selectivo (TSA). Posteriormente las placas se incubaron a 37°C de 18 a 24 horas.

Seguidamente se preparó una solución madre de la cepa tomando colonias del agar no selectivo y se inoculó en 5 ml de solución salina de peptona estéril; ajustando la turbidez con colonias bacterianas o solución salina de peptona estéril hasta que su turbidez sea comparable con el estándar de 0.5 McFarland que se preparó en el apartado 4.2.1.

Se marcó 7 tubos y se colocó en cada uno de ellos 9.9 mL de solución salina de peptona estéril. A partir de la solución madre ajustada a 0.5 en la escala de McFarland se tomó 0.1 mL de la cepa de interés (tubo 1) y se inoculó en el tubo 2 agitando hasta que se homogenice; este proceso se siguió hasta completar los 7 tubos previamente marcados.

Finalmente, del tubo que contienen 100 UFC se tomó con ayuda de una pipeta semiautomática y se inoculó en un medio sólido no selectivo (TSA). Se estiró según el método de extensión en superficie. Dicha solución se utilizó para los demás análisis microbiológicos.

### **2.10.3. Preparación de Ácido Clorhídrico 1 mol/L**

Se tomó 8.5 mL de HCl y se colocó en 100 mL de agua purificada para luego autoclavar en el Autoclave Vertical PHOENIX LUFERCO.

### **2.10.4. Preparación de Hidróxido de Sodio 1 mol/L**

Se pesó 4 g de NaOH y se colocó en 100 mL de agua purificada para luego autoclavar en el Autoclave Vertical PHOENIX LUFERCO.

### **2.10.5. Preparación de medios de cultivo**

Para preparar los medios de cultivo se siguió lo establecido en la **ISO (2015)**. Para ello, se calculó la cantidad de medio de cultivo a preparar de acuerdo a las instrucciones de cada proveedor. Se recogió agua purificada de producción y se verificó que la conductividad sea  $< 5 \frac{\mu\text{S}}{\text{cm}}$  y  $< 100 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$ . Luego con ayuda de una probeta, se colocó en el frasco el volumen de agua adecuado para la cantidad de medio de cultivo pesada. Por otro lado, se pesó el medio de cultivo deshidratado en un pesamuestras de papel aluminio.

Se colocó con cuidado el medio de cultivo en el frasco, procurando que no se formen grumos. Para una mejor disolución del medio se sometió al mismo a baño maría a 60°C.

Antes de la esterilización del medio de cultivo se ajustó el pH con HCl  $1 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$  o NaOH  $1 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$  en dependencia del medio procurando así que el pH sea el requerido luego de la esterilización.

Finalmente se colocó la cinta indicadora de esterilización en los frascos y se llevó a la autoclave a 121 ° C, 15 PSI por 15 min.



### 2.10.6. Condiciones de Incubación para los microorganismos

**Tabla 7**

*Condiciones de incubación para cada uno de los microorganismos*

Microorganismo	ATCC	Caldo de enriquecimiento	Condiciones de incubación (enriquecimiento)	Medio de cultivo (Subcultivo)	Condiciones de incubación (Subcultivo)
<b>Aerobios totales (<i>B. subtilis</i>)</b>	6633	NA	NA	*Agar Soya Trypticasa (TSA) *Plate Count Agar (PCA)	30°C - 35°C 3 a 5 días
<b>Mohos-levaduras (<i>A. brasiliensis</i>)</b>	16404	NA	NA	*Agar Sabouroud Dextrosa	20°C - 25°C 5 a 7 días
<b><i>E. coli</i></b>	8739	Caldo MacConkey	42°C A 44°C 24 a 48 horas	*Agar MacConkey	30°C - 35°C 18 a 72 horas
<b><i>S. enterica</i></b>	14028	Caldo Rappaport-Vassiliadis	30°C A 35°C 18 a 24 horas	*Agar Xilosa Lisina Desoxicolato	30°C - 35°C 18 a 48 horas

Microorganismo	ATCC	Caldo de enriquecimiento	Condiciones de incubación (enriquecimiento)	Medio de cultivo (Subcultivo)	Condiciones de incubación (Subcultivo)
<i>P. aeruginosa</i>	9027	NA	NA	*Agar Verde Brillante *Agar Ceftrimida	30°C - 35°C 18 a 72 horas
<i>S. aureus</i>	6538	NA	NA	*Agar Manitol Salado *Agar Baird Parker	30°C - 35°C 18 a 72 horas
<i>C. albicans</i>	10231	Caldo Sabouroud Dextrosa	30°C A 35°C 3 a 5 días	*Agar Sabouroud Dextrosa	30°C - 35°C 24 a 48 horas.

Nota: Tomado de *Examen Microbiológico de los Productos no Estériles: Pruebas de Recuento Microbiano y Microorganismos Específicos*, por (USP, 2021).

## **2.11. Procedimiento de análisis microbiológico**

### **2.11.1. Matrices**

Se empleó un producto por cada matriz farmacéutica: sólida, semisólida y líquida; tomando en cuenta que para su selección se realizó un análisis de riesgo, determinando así de cada grupo cual es la más susceptible a contaminación.

- Matriz Sólida: comprimidos masticables para uso oral.
- Matriz Semisólida: emulsión para uso tópico.
- Matriz Líquida: jarabe de uso oral.

### **2.11.2. Preparación de la muestra para verificación**

Según la **USP, 2021a** dependiendo el tipo de producto se realizó lo siguiente:

- ***Producto Soluble en Agua:*** se diluyó 10 g o 10 mL de muestra en 90 mL del diluyente Caldo Soja Trypticaseína (TSB). En caso de que el medio no se encontrara con el pH requerido, se ajustó el mismo con Ácido Clorhídrico o Hidróxido de Sodio 1 mol/L descritos en los puntos 2.10.3 y 2.10.4.
- ***Producto No Graso Insoluble en Agua:*** se diluyó 10 g o 10 mL de muestra en 90 mL del diluyente Caldo Soja Trypticaseína (TSB). Además, se adicionó 0.1g de Polisorbato 80 como un agente tensoactivo que favorecerá la suspensión de aquellas sustancias que son poco humectables. En caso de ser necesario se deberá ajustar el pH.

En cualquiera de los casos se homogenizó la muestra y se colocó 1 mL del inóculo que contiene de 10 - 100 UFC de la cepa ATCC a analizar.

Por otro lado, si el producto que se va a examinar tiene actividad antimicrobiana, ésta se neutralizó adicionando la cantidad establecida de Polisorbato 80 o neutralizante requerido para cada una de las matrices farmacéuticas. Dicha cantidad dependerá de las formulaciones, sin embargo, la concentración final no puede ser conocida considerando las especificaciones de confidencialidad de la

empresa, pero se encuentran dentro de los rangos recomendados por la Farmacopea de los Estados Unidos.

### **2.11.3. Preparación de los controles**

- ***Control Positivo***

Este control se realizó por triplicado. Para ello, se tomó 1 ml de la cepa y se adicionó en 90 ml del diluyente TSB. Se tomó 1 ml de la mezcla y se vertió en una placa Petri con Agar TSA. Luego, se llevó a incubación según las condiciones descritas en el apartado 2.10.6.

- ***Control Negativo***

Este control se realizó en una sola placa. Para ello, no se añadieron ni la cepa ni el producto a analizar, únicamente se tomó 1mL del diluyente TSB y se vertió en una placa Petri con Agar TSA. Luego, se llevó a incubación según las condiciones descritas en el apartado 2.10.6.

### **2.11.4. Recuento de aerobios totales, mohos y levaduras por el método de vertido en placa**

A continuación, se colocó en seis placas Petri vacías (3 para recuento de aerobios totales y 3 para mohos-levaduras); en las dos primeras 1 ml de la solución preparada en el apartado 2.11.2, en las dos placas siguientes 1 ml del control positivo y en las dos últimas, 1 ml del control negativo preparados en el apartado 2.11.3. Luego se vertió con agar TSA y SAB para la determinación de aerobios totales y mohos - levaduras respectivamente. Se incubó según las condiciones descritas en la Tabla 7. Una vez transcurrido el periodo de incubación se realizó el conteo de las colonias obtenidas (**USP, 2021a**).

### **2.11.5. Evaluación de ausencia/presencia de microorganismos específicos por el método de extensión en superficie**

Según **USP (2021b)** y la **AEFI (2001)**:

- ***P. aeruginosa***: se pesó 1g del producto y se disolvió en un frasco con 90 mL del diluyente. A cada frasco se inoculó de 10-100 UFC de las cepas e incubó a 30-35°C por 18 a 24 horas. A continuación, con un asa, se sembró del diluyente TSB a una placa de Agar Cetrimida. E incubó de 30-35°C durante un periodo de 18 a 72 horas.
- ***S. aureus***: se pesó 1g del producto y se disolvió en un frasco con 90 mL del diluyente. A cada frasco se inoculó de 10-100 UFC de las cepas e incubó a 30-35°C por 18 a 24 horas. A continuación, con un asa, se sembró del TSB a una placa de Agar Manitol Salado. E incubó de 30-35°C por 18 a 72 horas.
- ***E. coli***: se pesó 1 g del producto y disolvió en un frasco con 90 mL del diluyente. A cada frasco se inoculó de 10-100 UFC de las cepas e incubó a 30-35°C por 18 a 24 horas. Se extrajo 1 ml del TSB e inoculó en 100 mL de Caldo MacConkey, luego se llevó a incubación a 42-44°C por 24 a 48 horas. A continuación con un asa, se sembró del Caldo MacConkey en una placa con Agar MacConkey e incubó de 30-35°C por 18 a 72 horas.
- ***S. enterica.***: se pesó 10 g del producto y se disolvió en un frasco con 90 mL del diluyente. A cada frasco se inoculó de 10-100 UFC de las cepas e incubó a 30-35°C por 18 a 24 horas. A continuación, se extrajo 0.1 mL del frasco anterior, y se llevó a incubación en un tubo con 10 mL del Caldo Rappaport-Vassiliadis a una temperatura de 30 – 35°C por un periodo de 18 a 24 horas. Finalmente, con un asa, se sembró en una placa con Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) y se incubó de 30 – 35°C por 18 a 48 horas.
- ***C. albicans***: se pesó 10 g del producto y se disolvió en 90 mL de Caldo Dextrosa Sabouraud (SAB). A cada frasco se inoculó de 10-100 UFC de las cepas e incubó a una temperatura de 30-35°C por 3 a 5 días. A continuación, con un asa, se sembrará del Caldo Dextrosa Sabouraud a una placa de Agar Dextrosa Sabouraud. Finalmente se llevó a incubación por 24 a 48 horas de 30-35°C.

## 2.12. Verificación del método microbiológico para el recuento de aerobios totales y mohos-levaduras para el recuento en placa

La verificación del método microbiológico establecido se realizó conforme a lo descrito en la AEFI, en el cual se detalla que para el número de réplicas se puede seguir dos opciones: la primera efectuar el ensayo sobre muestras de tres lotes distintos del producto terminado, y la segunda, la cual se aplicó en este proyecto es sobre tres muestras diferentes que forman parte de un mismo lote (AEFI, 2001).

### 2.12.1. Exactitud

Este parámetro se evaluó una vez obtenido el porcentaje de recuperación de la prueba de recuento microbiano de las tres matrices farmacéuticas. Entonces, se comparó la cantidad de colonias obtenidas en los frascos que contienen la muestra, con respecto al grupo control. El valor de la exactitud es el promedio del porcentaje de recuperación (AEFI, 2001).

Se calculó en base a la siguiente Ecuación 1:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Microorganismos recuperados presencia del producto}}{\text{Microorganismos recuperados ausencia del producto}} \times 100$$

Dicho valor debe ser menor al 50% y no exceder el 200% de recuperación de los microorganismos que fueron analizados (Morales, 2018).

### 2.12.2. Precisión

Se calculó el valor de la desviación estándar de los conteos de colonias obtenidos luego de cada repetición en las pruebas de recuento microbiano para cada uno de las matrices farmacéuticas. El valor de la precisión es la congruencia existente en los datos respecto a la repetitividad del análisis.

Se calculó en base a la siguiente Ecuación 2:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

En donde,  $CV$  es el coeficiente de variación,  $s$  derivación estándar y  $\bar{x}$  media de los tantos por ciento de recuperación del microorganismo (AEFI, 2001).

### 2.12.3. Robustez

El ensayo de robustez permite garantizar dentro del espacio de diseño que el método microbiológico sigue proporcionando resultados fiables al evaluar los factores a condiciones establecidas en el mismo diseño experimental.

Los factores que se evaluaron son: temperatura de incubación, tiempo de incubación y tipo de placa frente a la variable respuesta Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo de producto a analizar, tanto para aerobios totales como mohos-levaduras.

**Tabla 8**

*Factores a evaluar en el recuento de aerobios totales*

<b>Factores</b>	<b>Niveles</b>				<b>Variable Respuesta</b>
Temperatura de Incubación	33°C	35°C	37°C		UFC/g
Tiempo de incubación	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	UFC/g
Tipo de Placa	Monopetri	Bipetri	Tripetri		UFC/g

**Tabla 9**

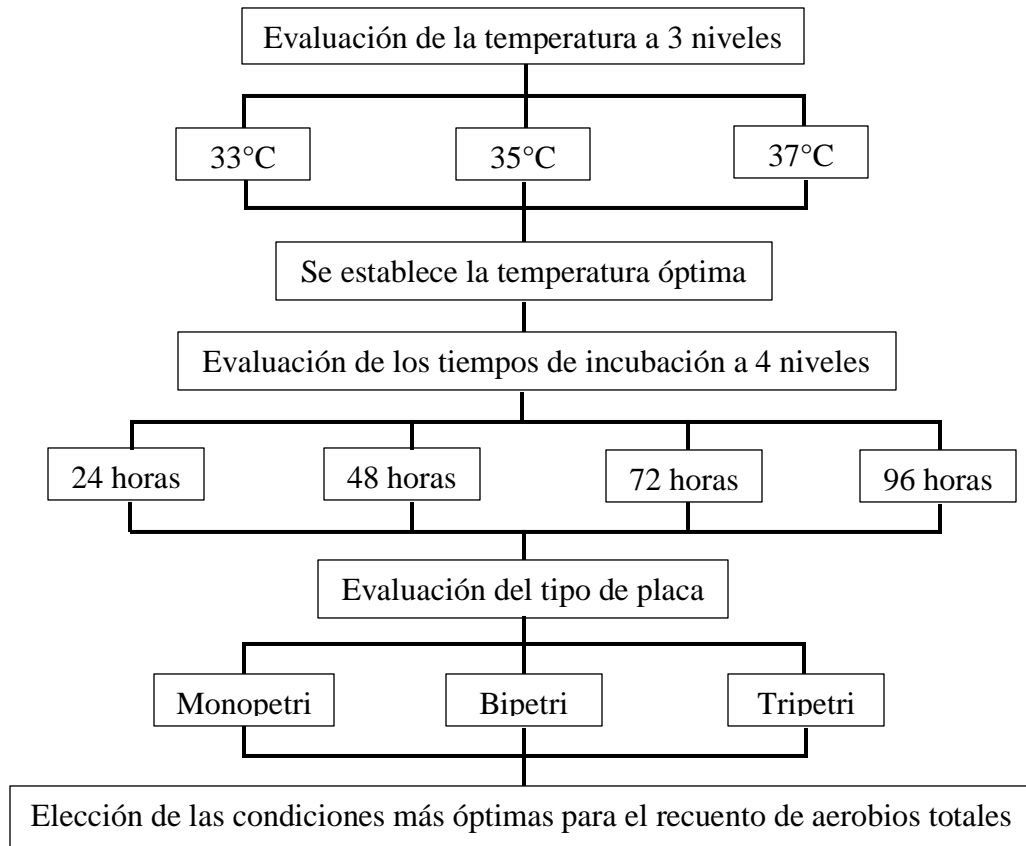
*Factores a evaluar en el recuento de mohos-levaduras*

<b>Factores</b>	<b>Valores</b>			<b>Variable Respuesta</b>
Tipo de placa	Monopetri (1)	Bipetri (2)	Tripetri (3)	UFC/g
Tiempo de incubación	120 horas	144 horas	168 horas	UFC/g

El diseño experimental que se siguió fue el siguiente:

**Figura 4**

*Diseño experimental para aerobios totales*

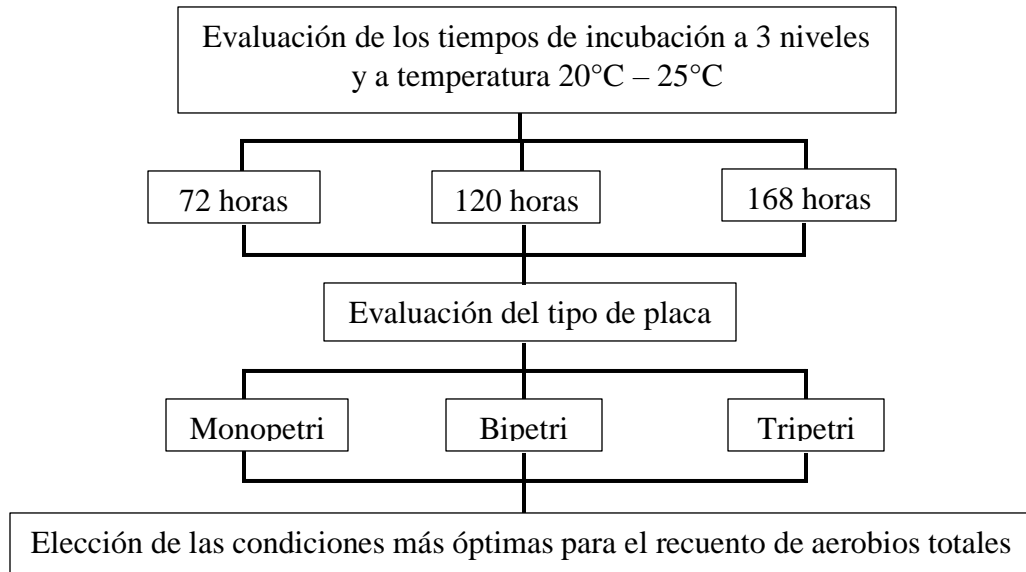


*Nota:* El diseño experimental muestra todo el proceso que se siguió para la obtención de las condiciones óptimas para el recuento de aerobios totales.



**Figura 5**

*Diseño experimental para mohos-levaduras*



*Nota:* El diseño experimental muestra todo el proceso que se siguió para la obtención de las condiciones óptimas para el recuento de mohos - levaduras.

En los diseños experimentales tanto de recuento de aerobios totales y mohos – levaduras se evaluó en base a una tabla ANOVA las UFC/g, en donde se determina si existen diferencias significativas entre los parámetros evaluados utilizando el “valor p” que tiene que ser mayor 0.05, es decir, un nivel de significancia del 5%.

### **2.13. Verificación del método microbiológico para la determinación de presencia/ausencia de microorganismos específicos por el método de extensión en superficie**

Para la verificación del método microbiológico para la determinación de presencia/ausencia de microorganismos específicos se comparó el crecimiento entre la solución control positivo (que contiene diluyente TSB\* más el inóculo de la cepa) y la muestra de la matriz farmacéutica (diluyente TSB más el inóculo de la cepa y la muestra).

Para que el estudio se considere válido se deberá observar la presencia de microorganismos específicos en la solución muestra.

\*En el caso que la matriz contenga conservantes se deberá neutralizar la misma adicionando la cantidad establecida de Polisorbato 80.

\*\*Entre las tres matrices farmacéuticas se abarca el estudio de todos los microorganismos específicos establecidos en la USP.

## **CAPÍTULO III**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Con la finalidad de verificar que la metodología es confiable para el análisis microbiológico de productos terminados no estériles de naturaleza líquida, sólida y semisólida del Laboratorio Neofarmaco del Ecuador Cía. Ltda., se realizó la verificación de ensayos microbiológicos; la misma que está fundamentada en asegurar que la calidad de dichos productos permiten la adecuada recuperación de microorganismos que pueden contaminar las diferentes matrices farmacéuticas.

Asimismo, tomando como referencia a las normativas internacionales y nacionales, las pruebas de verificación están clasificadas por pruebas de recuento microbiano, ensayos de exactitud, precisión y robustez, y de ausencia/presencia de microorganismos patógenos. Por otro lado, el empleo de cepas certificadas ATCC, otorga credibilidad a los ensayos gracias a las características propias de cada una de ellas, las cuales se conforman de microorganismos ambientales y patógenos que podrían provocar daños en la integridad del producto, además, los resultados indican que los productos evaluados son susceptibles a la contaminación de las cepas usadas, lo que fortalece la idea de que un ensayo de verificación aclara que los componentes que forman parte de un producto farmacéutico favorecen o inhiben el crecimiento de microorganismos.

**Verificación del método microbiológico Ausencia/Presencia de Microorganismos Específicos para las tres matrices farmacéuticas**

**Tabla 10**

*Resultados de la prueba de presencia/ausencia de microorganismos específicos*

<b>Matriz Farmacéutica</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Control Positivo</b>	<b>Control Negativo</b>	<b>Resultado (Presencia/Ausencia)</b>
Gotas Pediátricas	<i>S. aureus</i>	Presencia	Ausencia	Presencia
	<i>P. aeruginosa</i>	Presencia	Ausencia	Presencia
	<i>E. coli</i>	Presencia	Ausencia	Presencia
	<i>S. enterica</i>	Presencia	Ausencia	Presencia
Tabletas Masticables	<i>S. aureus</i>	Presencia	Ausencia	Presencia
	<i>P. aeruginosa</i>	Presencia	Ausencia	Presencia
	<i>E. coli</i>	Presencia	Ausencia	Presencia
Crema Vaginal	<i>S. enterica</i>	Presencia	Ausencia	Presencia
	<i>S. aureus</i>	Presencia	Ausencia	Ausencia
	<i>P. aeruginosa</i>	Presencia	Ausencia	Ausencia
	<i>E. coli</i>	Presencia	Ausencia	Ausencia
	<i>S. enterica</i>	Presencia	Ausencia	Ausencia
	<i>C. albicans</i>	Presencia	Ausencia	Ausencia

Las gotas pediátricas y tabletas masticables, están clasificados como fármacos orales, tanto en la prueba de recuento microbiano como en la de ausencia/presencia de microorganismos específicos ha dado resultados óptimos a la recuperación microbiana de bacterias aerobias y mohos-levaduras. En los resultados expuestos se observó que la recuperación microbiana es comparable entre el control positivo y el grupo de prueba, con esto, se comprueba que dicho producto no inhibe el crecimiento de microorganismos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en medicamentos orales en los que se emplean conservantes que evitan la contaminación del fármaco, estos excipientes inhiben el crecimiento de microorganismos, por lo cual se utilizó Tween 80 para neutralizar la

actividad conservante de los parabenos y así garantizar el óptimo crecimiento de los posibles microorganismos que se encuentren en la muestra tal como se muestra en la Tabla 10.

Por otro lado, la crema vaginal cuyos principios activos miconazol nitrato y metronidazol son agentes antimicrobianos intrínsecos inhibe el crecimiento de las cepas evaluadas, por lo que al realizar los ensayos de presencia/ausencia de microorganismos patógenos y de recuento de microorganismos no se evidenció crecimiento como se indica en la Tabla 10. Es importante señalar que el porcentaje de Tween 80 para este ensayo no tiene una acción neutralizante puesto que la crema no contiene conservantes en su formulación, más bien tiene un carácter emulsificante.

**Verificación de la Aptitud del Método Microbiológico para recuento microbiano de aerobios totales y mohos - levaduras.**

- **Exactitud y Precisión**

**Matriz Líquida - Gotas Pediátricas**

**Datos primarios:**

**Tabla 11**

*Datos primarios del recuento de aerobios totales – matriz líquida*

	<b>Réplica 1 (UFC/g)</b>	<b>Réplica 2 (UFC/g)</b>	<b>Réplica 3 (UFC/g)</b>
<i>B. subtilis</i>	23	21	22
<b>Inóculo</b>	28		

**Tabla 12**

*Datos primarios del recuento de mohos-levaduras – matriz líquida*

	<b>Réplica 1 (UFC/g)</b>	<b>Réplica 2 (UFC/g)</b>	<b>Réplica 3 (UFC/g)</b>
<i>A. niger</i>	21	22	19
<b>Inóculo</b>	25		

Los cálculos se realizaron en base a las ecuaciones 1 y 2 descritas en el apartado de metodología.

**Tabla 13**

*Resultados de exactitud y precisión para los recuentos de microorganismos en matriz líquida*

Microorganismo	%Recuperación Réplica 1	%Recuperación Réplica 2	%Recuperación Réplica 3	Exactitud	Precisión (CV)
<i>B. subtilis</i>	82.14%	75%	78.57%	Conforme	4.53
<i>A. niger</i>	84%	88%	76%	Conforme	7.39

### Matriz Sólida - Tabletas Masticables

**Datos primarios:**

**Tabla 14**

*Datos primarios del recuento de aerobios totales – matriz sólida*

	Réplica 1 (UFC/g)	Réplica 2 (UFC/g)	Réplica 3 (UFC/g)
<i>B. subtilis</i>	26	24	27
<b>Inóculo</b>		28	

**Tabla 15**

*Datos primarios del recuento de mohos-levaduras – matriz sólida*

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
<i>A. niger</i>	23	20	22
<b>Inóculo</b>		25	

Los cálculos se realizaron en base a las ecuaciones 1 y 2 descritas en el apartado de metodología.

**Tabla 16**

*Resultados de exactitud y precisión para los recuentos de microorganismos en matriz sólida*

Microorganismo	%Recuperación R1	%Recuperación R2	%Recuperación R3	Exactitud	Precisión (CV)
<i>B.s subtilis</i>	92.86%	85.71%	96.43%	Conforme	5.95
<i>A. niger</i>	92%	80%	88%	Conforme	7.05

De acuerdo a los parámetros establecidos en la AEFI la exactitud debe ser menor al 50% y no exceder el 200% de recuperación de microorganismos; y la precisión evaluada según el coeficiente de variación tiene que ser inferior al 20% (AEFI, 2001). Al evaluar estos parámetros, tanto la matriz líquida como sólida cumplen con las especificaciones establecidas para *B. subtilis* y *A. niger*. La matriz líquida con valores de precisión del 4.53 y exactitud del 78.57% para *B. subtilis*, y para *A. niger* con una exactitud de 82.67% y precisión de 7.39. Mientras que la matriz sólida obtuvo una exactitud de 91.67% y precisión del 5.95 para *B. subtilis*, y de 86.67% de exactitud y 7.05 de precisión en el caso de *A. niger*.

- **Robustez**

### **Matriz Líquida - Gotas Pediátricas**

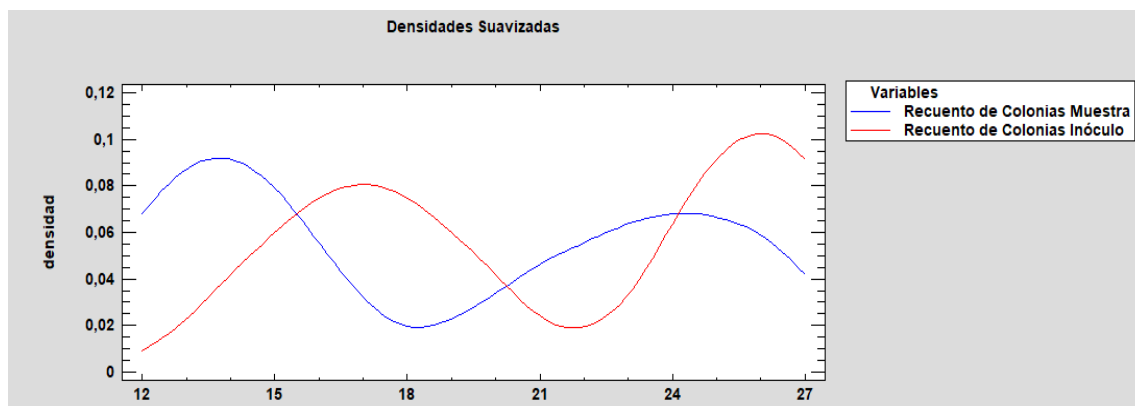
#### 1. Mohos – Levaduras

Se evaluaron los datos obtenidos bajo condiciones de: tiempo de incubación (72 h – 3 días, 120 h – 5 días y 168 h – 7 días) y tipo de placa (monopetri, bipetri y tripetri). Estas condiciones se establecieron tomando en cuenta los criterios establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos para el recuento de mohos-levaduras en productos no estériles.

## Tiempo de Incubación

**Figura 6**

*Comparación de dos muestras independientes*



*Nota:* Se muestran dos gráficos que guardan simetría entre sí, pero se encuentran desplazados por el factor tiempo de incubación.

Se evaluó el parámetro tiempo de incubación entre el control positivo (inóculo) y el grupo prueba (muestras) para determinar si son estadísticamente similares. En el software estadístico STATGRAPHICS se realizó una comparación de muestras independientes como se observa en la Figura 4, dando como resultados un valor de  $p$  mayor a 0.05 (0.390434) al comparar el valor de medias de ambas muestras, lo que significa que son estadísticamente iguales, es decir el conteo de *A. niger* tanto del control positivo y el control de prueba presenta datos comparables.

En este caso se descartó el análisis a las 168 h (7 días) de incubación, porque las colonias de *Aspergillus* en el Agar Saboroud Dextrosa fueron incontables, es por ello que en la parte estadística este factor se descartó porque no se tuvo un dato numérico exacto para el diseño estadístico.



**Tabla 17**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de Aspergillus niger por Tiempo de Incubación*

Tiempo de Incubación	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
72	6	15,3333	0,721153	x
120	6	24,8333	0,721153	x

Contraste	Sig.	Diferencia +/-	Límites
72 - 120	*	-9,5	2,3071

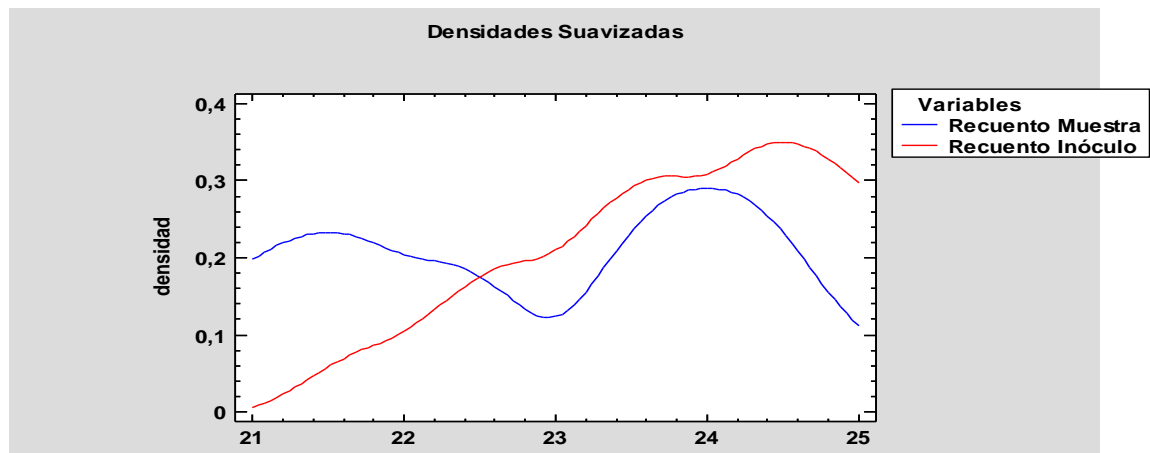
Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco indica que las muestras son estadísticamente diferentes con un nivel del 95% de confianza.

Con estos análisis expuestos en la Figura 4 y Tabla 14 se determinó que el tiempo de incubación de 120 horas (5 días) recupera una cantidad mayor de colonias, por lo que con este parámetro se procedió al siguiente ensayo de robustez para mohos – levaduras.

### Tipo de Placa

**Figura 7**

*Comparación de dos muestras independientes*



*Nota:* Se muestran dos gráficos que guardan cierta simetría entre sí, pero se encuentran desplazados por el factor tipo de placa.

Al evaluar estadísticamente el control positivo y grupo prueba como muestras independientes se obtuvo un valor de p superior a 0.05 (0.114111) indicando que las medias son estadísticamente iguales, es decir, mismos valores de recuperación para *Aspergillus niger* en ambas muestras como se indica en la Figura 5.

**Tabla 18**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de Aspergillus niger por Tipo de Placa*

<b>Tipo de Placa</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
Monopetri (1)	3	22,0000	0,860663	x
Bipetri (2)	3	23,3333	0,860663	x
Tripetri (3)	3	23,3333	0,860663	x

<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>
Monopetri (1) – Bipetri (2)		1,33333	2,97829
Monopetri (1) – Tripetri (3)		0	2,97829
Bipetri (2) – Tripetri (3)		-1,33333	2,97829

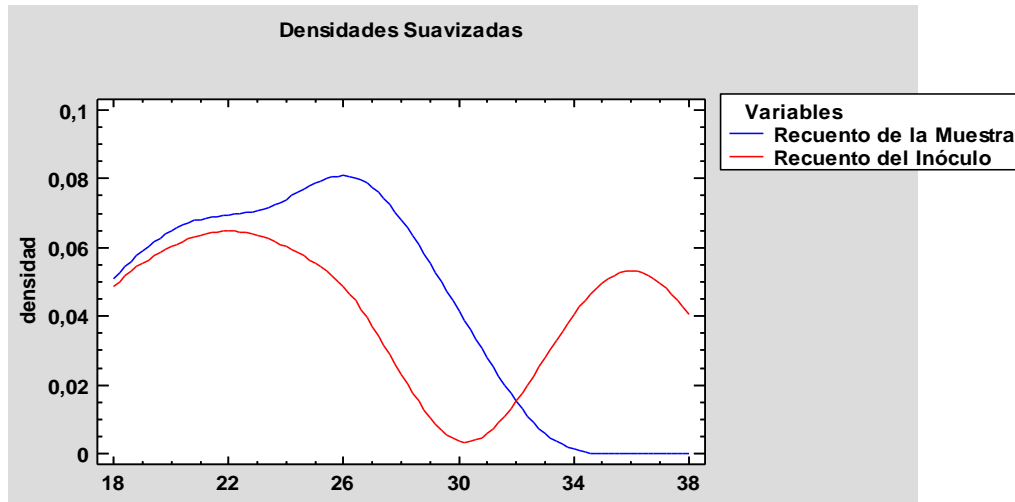
Luego de evaluar en el software estadístico el tipo de placa, los resultados mostraron que este factor no influye en el recuento de *A. niger*, es decir, que la cantidad de UFC/g es proporcional en cajas monopetri, bipetri y tripetri.

2. Aerobios Totales

**Temperatura de Incubación**

**Figura 8**

*Comparación de dos muestras independientes*



*Nota:* La figura muestra el comportamiento de las dos variables respecto al factor temperatura de incubación.

Mediante el análisis estadístico en el software STATGRAPHICS se observó que la temperatura de 37°C a diferencia de las demás en el grupo prueba tiene una recuperación bastante alejada al control positivo, es decir, muestra un valor p menor al 0,05 (0,000608178), por lo que no se la podría considerar para los otros ensayos pese a que la recuperación es mayor a la que se obtuvo a 33°C y 35°C como se muestra en la tabla 19.

**Tabla 19**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de Bacillus subtilis por Temperatura de Incubación*

Temperatura de Incubación	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
33	3	19,0	0,57735	x
35	3	24,0	0,57735	x
37	3	28,0	0,57735	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
33 - 35	*	-5,0	1,9979
33 - 37	*	-9,0	1,9979
35 - 37	*	-4,0	1,9979

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra junto a los 3 pares indica que estos muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. Como se mencionó anteriormente, a pesar de que a 37°C se obtiene una mejor recuperación de bacterias aerobias, ésta no es comparable con el control positivo, es así que se tomó la temperatura de 35°C tal como especifica en la Farmacopea para los siguientes ensayos de aerobios totales para la matriz líquida.

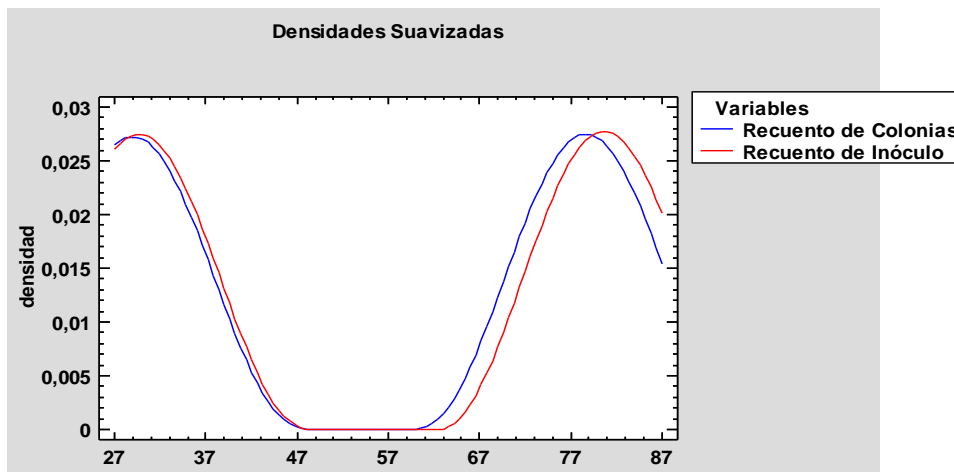
En cada uno de los ensayos es importante observar cual es el factor que permite una mejor recuperación de microorganismos, pero también hay que tener en cuenta que dicha recuperación sea comparable entre el control positivo y el grupo prueba.

### Tiempo de Incubación

Los tiempos evaluados fueron 48 horas y 72 horas, se descartó el análisis estadístico a las 24 horas porque no hubo crecimiento de colonias de *B. subtilis*, y a las 96 horas ya que el crecimiento fue superior a las 100 UFC/g permitidas según las especificaciones.

### Figura 9

*Comparación de dos muestras independientes*



*Nota:* La figura indica que las variables “recuento de colonias” (muestra) y “recuento de inóculo” (Control Positivo) guardan simetría.

Se ejecutó una prueba-t para comparar las medias entre las dos variables, los resultados se basaron en el valor p obtenido que fue de 0,934976. Este valor indica que no hay diferencias significativas entre las dos variables, mostrando así que las medias del control positivo y del grupo prueba son iguales.

**Tabla 20**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de B. subtilis por Tiempo de Incubación*

<b>Tiempo de Incubación</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
48	6	29,0	1,0274	x
72	6	78,6667	1,0274	x

<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia +/-</b>	<b>Límites</b>
48 - 72	*	-49,6667	4,03409

Al analizar el grupo prueba respecto al factor “tiempo de incubación” se determinó que con los dos se recupera una cantidad considerable de UFC/g como se muestra en la Tabla 20 y Figura 9; es decir, se podrían considerar el tiempo de 48 horas o 72 horas para el análisis microbiológico de recuento de aerobios totales en la matriz líquida con factor “tipo de placa”.

### **Tipo de Placa**

Para este ensayo se tomó en cuenta la temperatura óptima de 35°C y el tiempo de incubación de 48 horas.

**Tabla 21**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de Bacillus subtilis por Tipo de Placa*

<b>Tipo de Placa</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
Monopetri (1)	3	24,0	0,471405	x
Bipetri (2)	3	24,0	0,471405	x
Tripetri (3)	3	25,0	0,471405	x

Contraste	Sig.	Diferencia +/-	Límites
Monopetri (1) – Bipetri (2)		-1,0	1,63128
Monopetri (1) – Tripetri (3)		0	1,63128
Bipetri (2) – Tripetri (3)		1,0	1,63128

Esta tabla determinó que el tipo de placa no influye en el recuento de bacterias aerobias siempre y cuando el inóculo que se coloque en cada placa sea proporcional a la misma. Con todos estos ensayos se observó que las condiciones de incubación óptimas para el recuento de aerobios totales son: temperatura de 35°C, tiempo de 48 horas o 72 horas como máximo y con el empleo de cualquier tipo de placa Petri, ya sea mono, bi o tripetri.

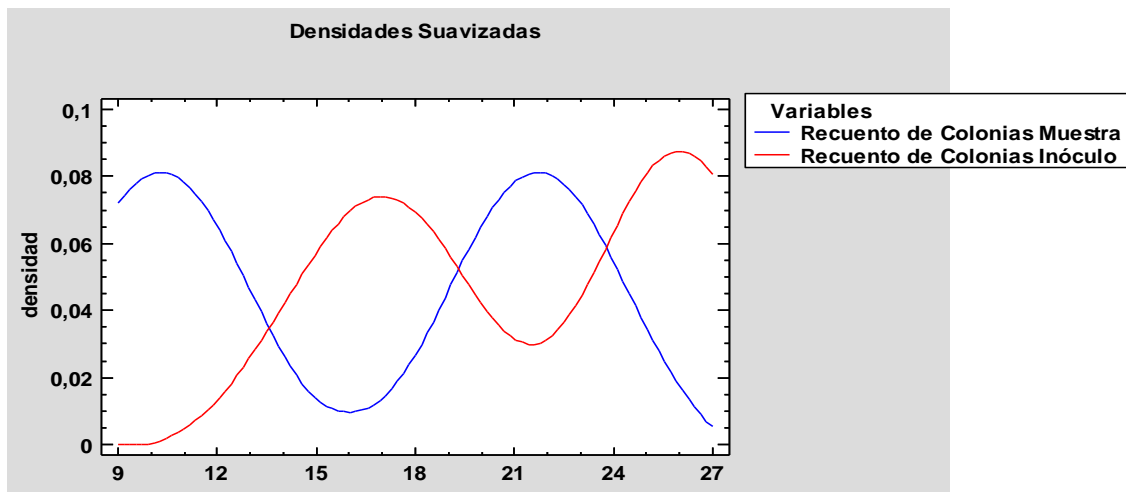
### Matriz Sólida – Tabletas Masticables

#### 1. Mohos – Levaduras

#### Tiempo de Incubación

**Figura 10**

*Comparación de dos muestras independientes*



*Nota:* Se muestran dos gráficos que guardan simetría entre sí, pero se encuentran desplazados por el factor tiempo de incubación.

En base a la Figura 10 se muestran que tanto el recuento de colonias en el grupo prueba y el control positivo son simétricas, esto también se fundamenta con el valor p que se obtuvo

de 0,130042 el mismo que es mayor a 0,05; y por tanto demuestra que no existe diferencia significativa entre las medias de las dos muestras.

**Tabla 22**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de Aspergillus niger por Tiempo de Incubación*

<b>Tiempo de incubación</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
72	6	10,3333	0,881917	x
120	6	21,6667	0,881917	x

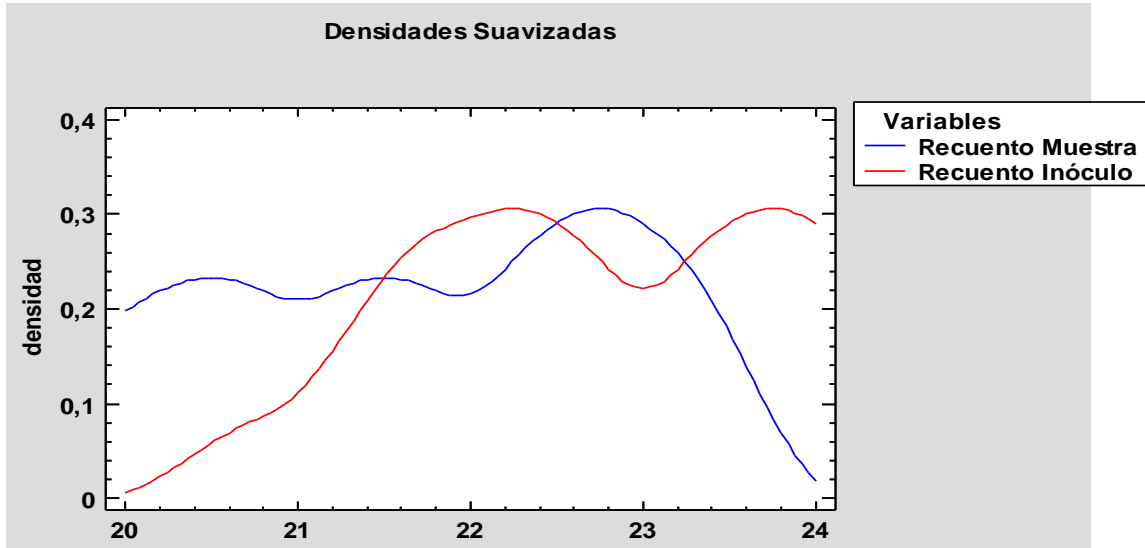
<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>
72 - 120	*	-11,3333	3,46285

Esta tabla 19 de igual forma aplica un procedimiento de comparación múltiple. El asterisco en la tabla significa que las muestras presentan diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95,0%. Al igual que en la matriz líquida, en esta se obtiene una mejor recuperación a las 120 horas (5 días) y un conteo incontable a las 168 horas (7 días). Con este resultado se dio paso al análisis estadístico con el factor: tipo de placa.

## Tipo de Placa

**Figura 11**

*Comparación de dos muestras independientes*



*Nota:* La figura de densidades suavizadas indica el comportamiento de las dos variables: grupo prueba (muestra) y control positivo (inóculo).

Se realizó una comparación de las medias de ambas muestras mediante una prueba-t, la misma que indicó un intervalo de confianza que se extiende desde 2,27104 hasta 0,0488162. Puesto que el intervalo contiene el valor de 0, no hay diferencia significativa entre las medias de las dos muestras de datos, a un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla 23**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de A. niger por Tipo de Placa*

Tipo de Placa	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Monopetri (1)	3	21,5	1,50385E-8	x
Bipetri (2)	3	21,5	1,50385E-8	x
Tripetri (3)	3	21,5	1,50385E-8	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Monopetri (1) – Bipetri (2)		0	6,82958E-8
Monopetri (1) – Tripetri (3)		0	7,74401E-8
Bipetri (2) – Tripetri (3)		0	8,1629E-8



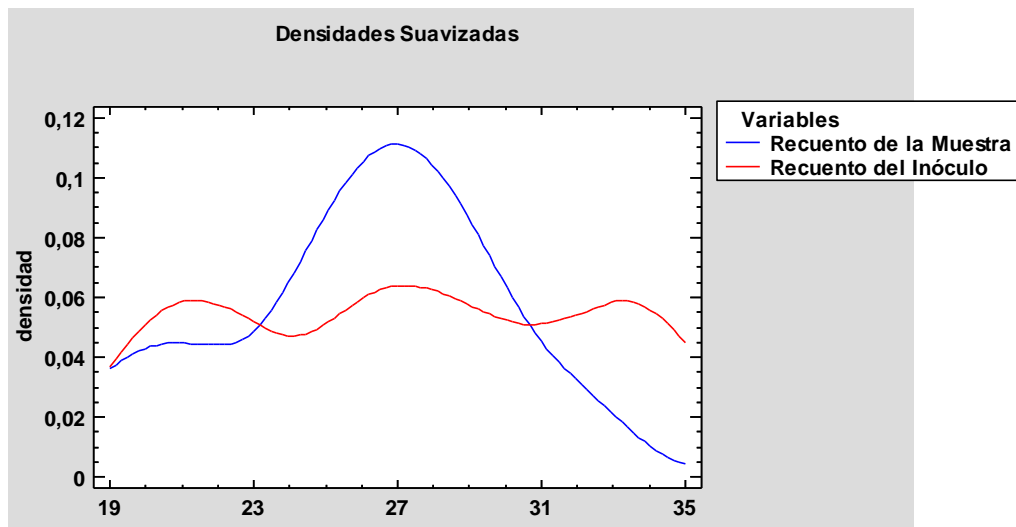
Estos resultados al igual que los obtenidos para la matriz líquida indicaron que el factor “tipo de placa” no tiene influencia sobre el recuento de *A. niger*, es decir, que la cantidad de UFC/g es proporcional en cajas monopetri, bipetri y tripetri. Así que, para cualquiera de las matrices se podría emplear análisis en tipos de placa monopetri, bipetri o tripetri con el fin de reducir los costos en la industria farmacéutica.

## 2. Aerobios Totales

### Temperatura de Incubación

**Figura 12**

*Comparación de dos muestras independientes*



*Nota:* La figura indica cómo actúa cada una de las variables respecto al factor temperatura de incubación, a través de un gráfico de densidades suavizadas.

Este ensayo es similar al que se realizó con la matriz líquida – gotas pediátricas para el recuento de aerobios totales, ya que el mayor recuento de UFC/g se logra a 37°C, sin embargo, los resultados no guardan relación con el inóculo, demostrado también con el valor p inferior a 0,05 (0,00582062). Es por esta razón que la temperatura de 37°C queda fuera de los demás ensayos. Para entender mejor los resultados se realizó la siguiente tabla de medias la cual permitirá obtener la temperatura óptima para el recuento de *B. subtilis*.

**Tabla 24***Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de B. subtilis por Temperatura de Incubación*

<b>Temperatura de incubación</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
33	3	20,0	1,30526	x
35	3	26,6667	0,922958	x
37	3	28,0	0,922958	x

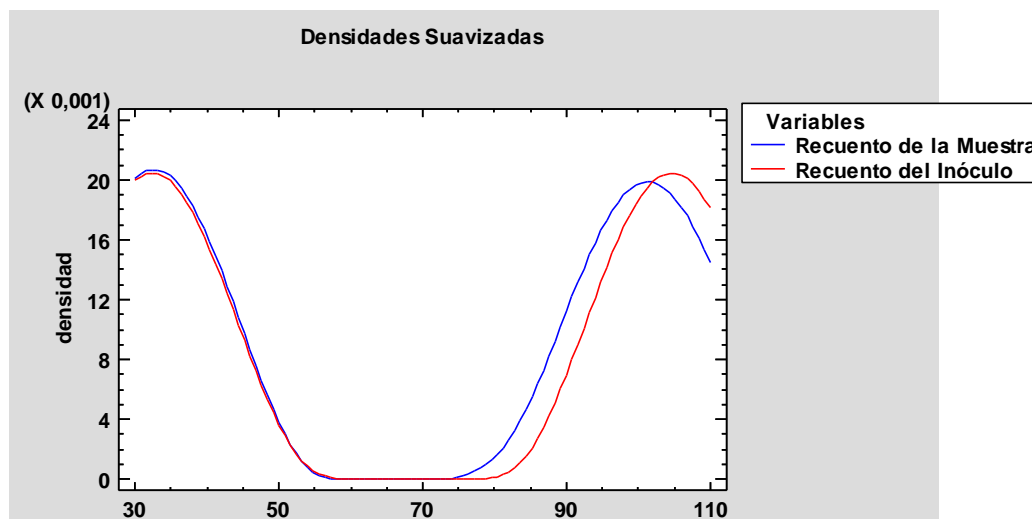
<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>
33 - 35	*	-6,66667	3,48308
33 - 37	*	-8,0	3,48308
35 - 37		-1,33333	2,84392

La tabla demuestra que existen diferencias significativas (\*) entre los pares 33 – 35 y 33 – 37, sin embargo los pares 35 – 37 son homogéneos y tienen las medias de recuento de colonias mayores a las de 33°C. Con esto se puede tomar a la temperatura de 35°C como óptima para la recuperación de bacterias aerobias y así analizar el siguiente factor de tiempo de incubación.

## Tiempo de Incubación

**Figura 13**

*Comparación de dos muestras independientes*



*Nota:* Se muestran dos gráficos que guardan simetría entre sí, pero se encuentran desplazados por el factor tiempo de incubación.

**Tabla 25**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de B. subtilis por Tiempo de Incubación*

Tiempo de Incubación	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
48	6	32,6667	1,76383	x
72	6	101,333	1,76383	x

Contraste	Sig.	Diferencia +/- Límites
48 - 72	*	-68,6667 6,92569

Se descarta el análisis a un tiempo de incubación 96 horas porque el crecimiento de *B. subtilis* es mayor al límite establecido por los organismos internacionales que son máximo 100 UFC/g, lo mismo sucede a las 72 horas. Además, a las 24 horas de incubación no se evidencia crecimiento de aerobios totales por ello no se reporta en la tabla 25. Con este análisis estadístico se estableció que el tiempo de incubación óptimo para el crecimiento

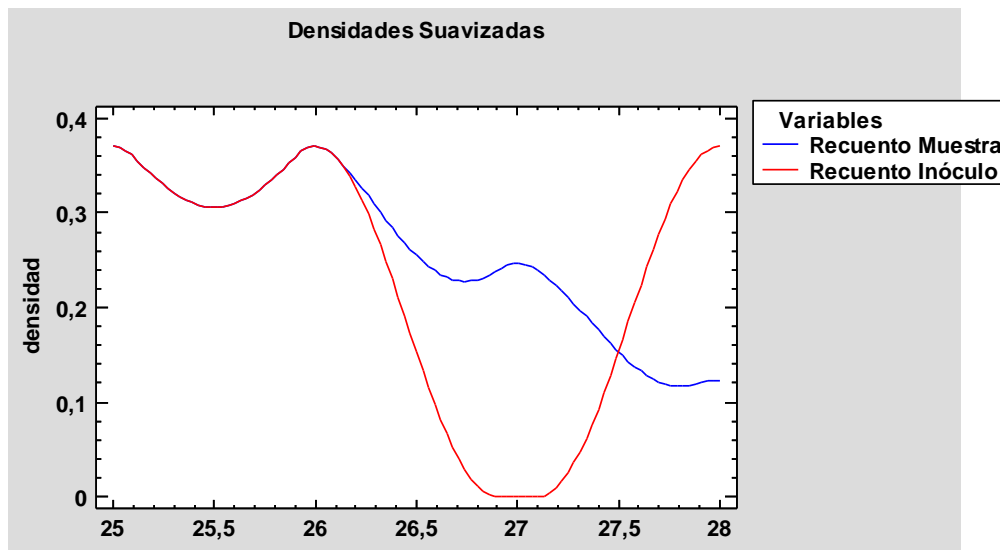
de *Bacillus subtilis* es de 48 horas con un resultado de recuperación que se encuentra entre las 10 – 100 UFC/g permitidas.

### Tipo de Placa

Una vez evaluados la temperatura y el tiempo de incubación, y establecido que las condiciones óptimas son a 35°C y 48 horas de incubación se procedió a realizar el último ensayo con el factor tipo de placa. Los resultados de este ensayo se muestran a continuación.

**Figura 14**

*Comparación de dos muestras independientes*



*Nota:* La figura indica cómo actúa cada una de las variables respecto al factor tipo de placa, a través de un gráfico de densidades suavizadas.

**Tabla 26**

*Pruebas de Múltiple Rangos para Recuento de *B. subtilis* por Tipo de Placa*

Tipo de Placa	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Monopetri (1)	3	25,3333	0,509175	x
Bipetri (2)	3	26,0	0,509175	x
Tripetri (3)	3	27,0	0,509175	x

<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>
Monopetri (1) – Bipetri (2)	1,0	1,76198	1,76198
Monopetri (1) – Tripetri (3)	1,66667	1,76198	1,76198
Bipetri (2) – Tripetri (3)	0,66667	1,76198	1,76198

Al evaluar las variables del grupo prueba y el control positivo con la prueba-t en el software estadístico STATGRAPHICS se obtuvo un valor p de 0,346414 lo cual indica que no hay diferencia significativa entre las medias de las dos muestras de datos, con un nivel de confianza del 95,0%.

Dicho esto, las mejores condiciones para el análisis microbiológico de recuento microbiano para la matriz sólida – tabletas masticables son similares a las obtenidas para la matriz líquida, es decir: temperatura de 35°C, tiempo de incubación de 48 horas y con cualquier tipo de placa (monopetri, bipetri y tripetri).

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones:

- Los resultados demostraron que cada uno de los productos utilizados en este estudio no inhiben el crecimiento de bacterias ni hongos con la técnica verificada.
- Los valores de la exactitud se mantuvieron en un factor de 2 con respecto al control, es decir, que no fueron menor al 50% ni excedieron el 200% de recuperación de los microorganismos *B. subtilis* y *A. niger* analizados según la USP. Además, se observó gráficamente que los porcentajes de recuperación obtenidos son similares en cada cepa para las tres réplicas del mismo lote que se tomó como muestra para la verificación, por lo tanto, se concluye que las muestras cumplen con los parámetros de exactitud. Demostrando que el método es preciso y exacto; ya que es exacto respecto al control positivo y preciso con respecto a sus tres réplicas.
- En el recuento de aerobios totales y mohos – levaduras se puede utilizar cajas monopetri, bipetri y tripetri porque los resultados arrojaron valores  $p$  mayores a 0,05; es decir, no existe diferencias significativas entre ellos.
- Se determinó que las condiciones adecuadas para la incubación de aerobios totales son para las matrices analizadas son: temperatura de 35°C, tiempo de 48 horas y con el uso de cualquier tipo de placa petri. Y para mohos – levaduras es a una temperatura entre 20°C – 25°C, un tiempo de incubación de 120 h (5 días) y con cualquier tipo de placa siempre y cuando se coloquen inóculos proporcionales en cada una de ellas.
- Los métodos realizados quedan verificados para la aptitud del método microbiológico de recuento e identificación de microorganismos específicos para las tres matrices farmacéuticas: sólida (tabletas), semisólida (crema vaginal) y líquido (gotas pediátricas).

**Recomendaciones:**

- Se recomienda evaluar otros medicamentos susceptibles a contaminación microbiana bajo los parámetros establecidos por organismos confiables como USP o AEFI.
- Utilizar neutralizantes específicos de acuerdo al conservante incluido en la formulación.
- Ejecutar ensayos preliminares para conocer la cantidad exacta de neutralizante que deberá ocupar para cada una de las formas farmacéuticas.
- Conocer el tipo de excipiente utilizado en la fabricación de cada una de las formas farmacéuticas.
- Se recomienda utilizar un caldo nutritivo como TSB y perlas de sílica porque esta ayudará a romper las paredes y obtener una mezcla homogénea en el caso de que las cepas no se disuelvan en solución salina al momento de ajustar al McFarland.

## B. MATERIALES DE REFERENCIA

- Abbasian, F., Ghafar, E., & Magierowski, S. (2018). Microbiological sensing technologies: A review. *Bioengineering*, 5(1), 1–33.  
<https://doi.org/10.3390/bioengineering5010020>
- Agencia Nacional de Regulación Control y Vigilancia Sanitaria - ARCSA. (2018). *Normativa de Buenas Prácticas para Laboratorios Farmaceuticos*. Ecuador. Retrieved from [https://www.gob.ec/sites/default/files/regulations/2018-11/Documento\\_ARCSA-DE-008-2018-JCGO\\_NTS-Buenas-Practicas-Manufactura-Lab-Farmacéuticos.pdf](https://www.gob.ec/sites/default/files/regulations/2018-11/Documento_ARCSA-DE-008-2018-JCGO_NTS-Buenas-Practicas-Manufactura-Lab-Farmacéuticos.pdf)
- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria - AEFI. (2001). *Validación de Métodos Analíticos* (Primera Ed). Barcelona. Retrieved from [https://www.academia.edu/10365264/Validacion\\_de\\_Metodos\\_Analiticos\\_Asociacion\\_Espanola\\_de\\_Farmacéuticos\\_de\\_la\\_Industria](https://www.academia.edu/10365264/Validacion_de_Metodos_Analiticos_Asociacion_Espanola_de_Farmacéuticos_de_la_Industria)
- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, & Organización Mundial de la Salud - CDC. (2009). Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo. *Medicina & Laboratorio*, 15(03–04), 171–196.
- 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*. División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos Subcomisión de Buenas Prácticas.
- 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>
- Farmacopea de los Estados Unidos - USP. (2021a). *Capítulo 61: Examen*



*microbiológico de productos no estériles: Pruebas de Recuento Microbiano*. Retrieved from [https://online.uspnf.com/uspnf/document/4\\_GUID-0392F79D-1F8A-4B8D-BEC8-C6FD7B39966F\\_1\\_es-ES](https://online.uspnf.com/uspnf/document/4_GUID-0392F79D-1F8A-4B8D-BEC8-C6FD7B39966F_1_es-ES)

Farmacopea de los Estados Unidos - USP. (2021b). *Capítulo 62: Examen Microbiológico de productos no estériles: Pruebas de Microorganismos Específicos*. Retrieved from [https://online.uspnf.com/uspnf/document/4\\_GUID-A68DE4C6-A898-490B-8198-C9FE1ADF1B60\\_1\\_es-ES](https://online.uspnf.com/uspnf/document/4_GUID-A68DE4C6-A898-490B-8198-C9FE1ADF1B60_1_es-ES)

Hernández, O., Ulloa, Y., Del Río, D., & Del Carmen, M. (2005). *Saphylococcus aureus y su identificación en los laboratorios microbiológicos: revisión bibliográfica*. *Arch. Méd. Camaguey*, 9(1), 142–152. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-02552005000100016](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552005000100016)

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

Organización Internacional de Normalización - ISO. (2015). *Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua (UNE-EN ISO 11133)*. Retrieved from <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?c=N0065038>

Organizacion Mundial de la Salud - OMS. (2010). *Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos*. Washington, DC. Retrieved from <file:///C:/Users/DOCENTE/Downloads/Espanol-control-calidad-laboratorios-farmaceuticos.pdf>

Organizacion Mundial de la Salud - OMS. (2013). *Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica*. Washington, DC. Retrieved from <https://servicios.unileon.es/gestion-de-residuos/wp-content/blogs.dir/34/files/2014/03/guia-de-seguridad-y-buenas-practic-as-en-el-laboratorio.pdf>

Pasachova, J., Ramirez, S., & Muñoz, L. (2019). *Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular*. *Nova*, 17(32), 25–38.

<https://doi.org/10.22490/24629448.3631>

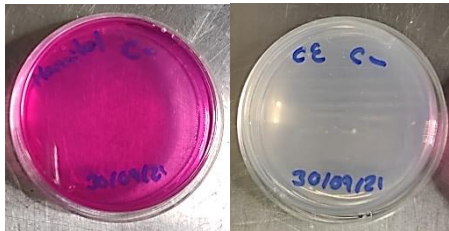
- Perilla, L. (2013). *Verificación de la aptitud de las pruebas de recuento microbiano y pruebas de microorganismos específicos para productos terminados elaborados en Anglopharma S. A.* Pontificia Universidad Javeriana.
- Polka, J., & Silver, P. (2014). Induced sensitivity of *Bacillus subtilis* colony morphology to mechanical media compression. *PeerJ*, 1–12. <https://doi.org/10.7717/peerj.597>
- 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>
- Simbron de la Cruz, M., & Ysuhualas, E. (2020). *Validación de Aptitud del Método Microbiológico de Recuento y Microorganismos Específicos para Sulfametoxazol + Trimetoprima en tableta recubierta* (Universidad Norbert Wiener). Universidad Norbert Wiener. Retrieved from  
[http://repositorio.uwiener.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/123456789/3931/T061\\_45807710\\_46818914\\_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uwiener.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/123456789/3931/T061_45807710_46818914_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Tam, M., Wibowo, D., & Rehm, B. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8671), 1–25.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Tong, S., Davis, J., Eichenberger, E., Holland, T., & Fowler, V. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>

Villacís, A. (2021). *Diseño de un manual de buenas prácticas de manufactura para la empresa Laboratorio Génesis ubicada en la provincia de Tungurahua en la ciudad de Ambato*. Universidad Técnica de Ambato.

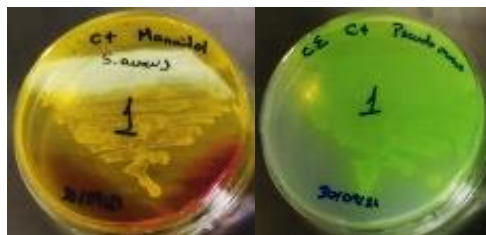
Yesid, A., & Sánchez, L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Ciencias Biomédicas*, 10(18), 135–250. <https://doi.org/10.22490/24629448.1003>

### C. ANEXOS

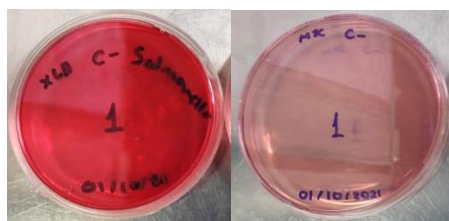
**Anexo 1:** Controles Negativos *P. aeruginosa* (Agar CE) y *S. aureus* (Agar Mannitol Salado)



**Anexo 2:** Controles Positivos *P. aeruginosa* (Agar CE) y *S. aureus* (Agar Mannitol Salado)



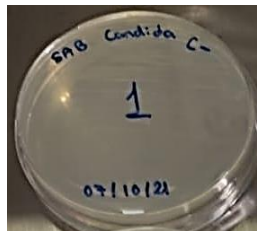
**Anexo 3:** Controles Negativos *S. enterica* (Agar XLD) y *E. coli* (Agar MacConkey)



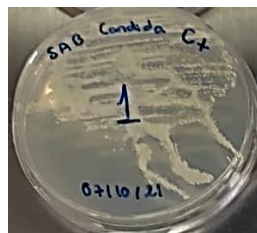
**Anexo 4:** Controles Positivos *S. enterica* (Agar XLD) y *E. coli* (Agar MacConkey)



**Anexo 5:** Control Negativo de *C. albicans*



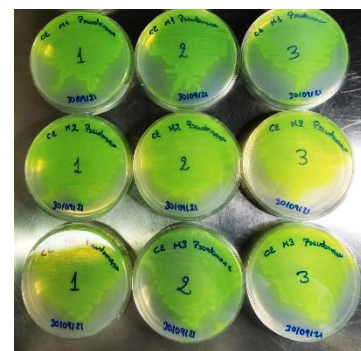
**Anexo 6:** Control Positivo de *C. albicans*



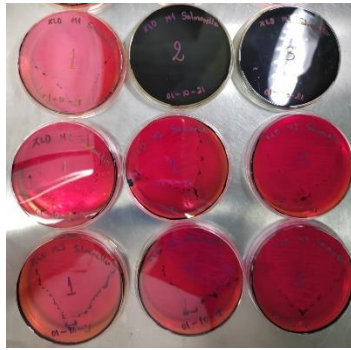
**Anexo 7:** Ensayos de presencia/ausencia de patógenos en Matriz Farmacéutica Líquida (Gotas Pediátricas)



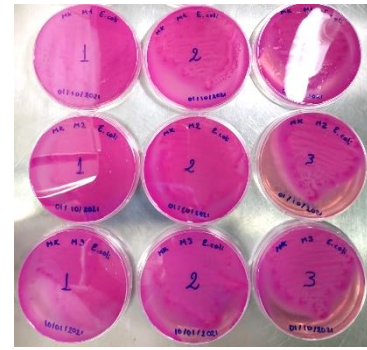
*S. aureus* (Agar Mannitol Salado)



*P. aeruginosa* (Agar CE)

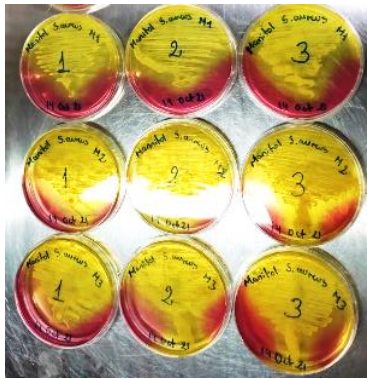


*S. enterica* (Agar XLD)

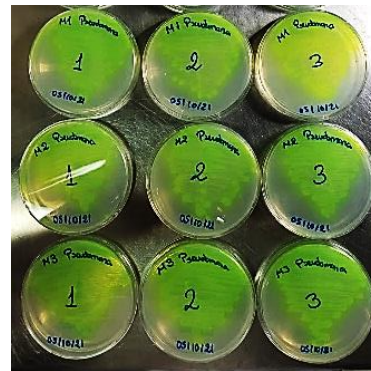


*E. coli* (Agar MacConkey)

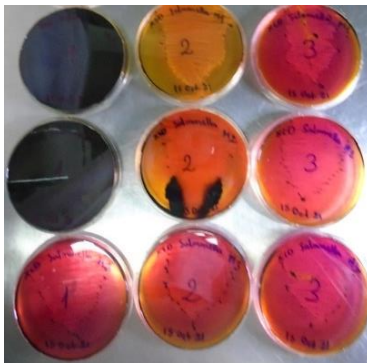
**Anexo 8:** Ensayos de presencia/ausencia de patógenos en Matriz Farmacéutica Líquida (Tabletas Masticables)



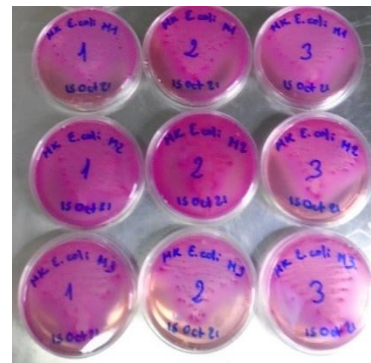
*S. aureus* (Agar Mannitol Salado)



*P. aeruginosa* (Agar CE)

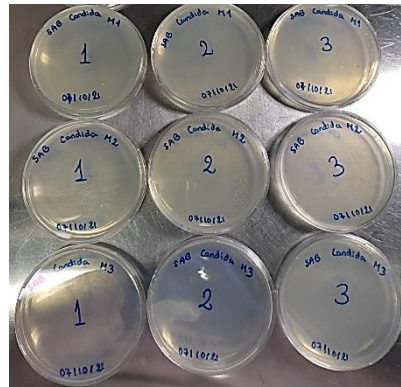


*S. enterica* (Agar XLD)



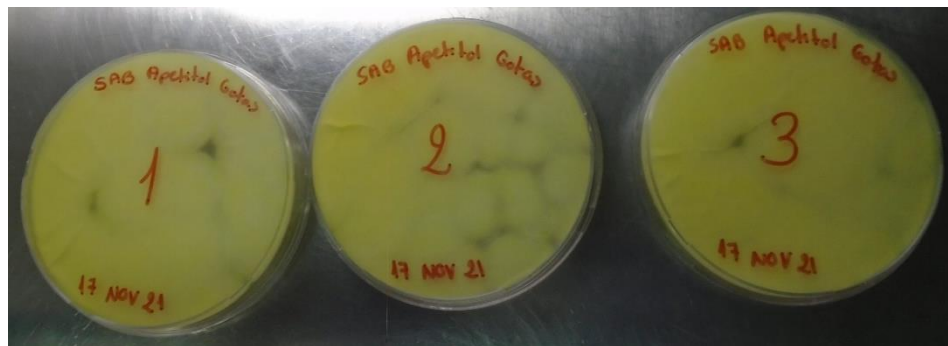
*E. coli* (Agar MacConkey)

**Anexo 9:** Ensayos de presencia/ausencia de patógenos en Matriz Farmacéutica Líquida (Crema Vaginal)



*C. albicans* (Agar SAB)

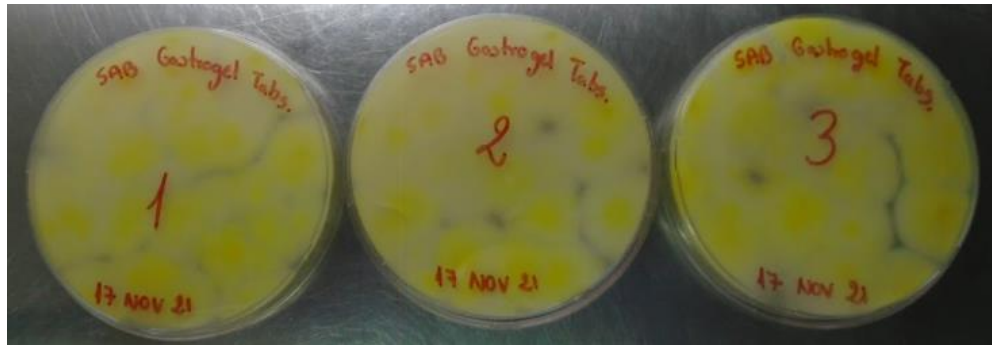
**Anexo 10:** Recuento de mohos-levaduras a los 5 días de incubación matriz líquida



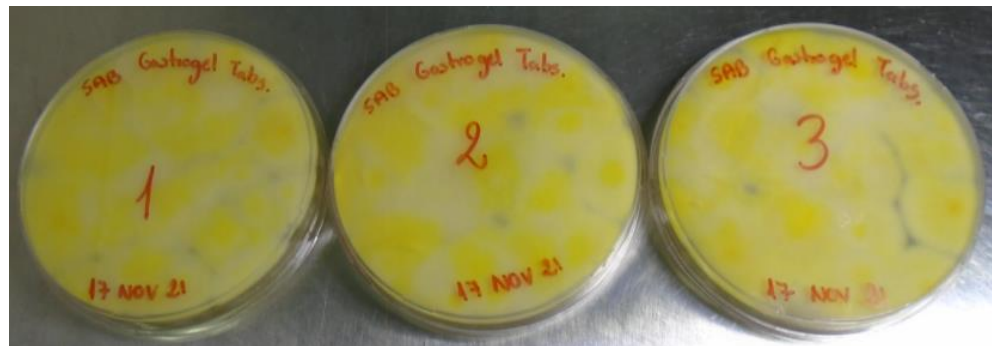
**Anexo 11:** Recuento de mohos-levaduras a los 7 días de incubación matriz líquida



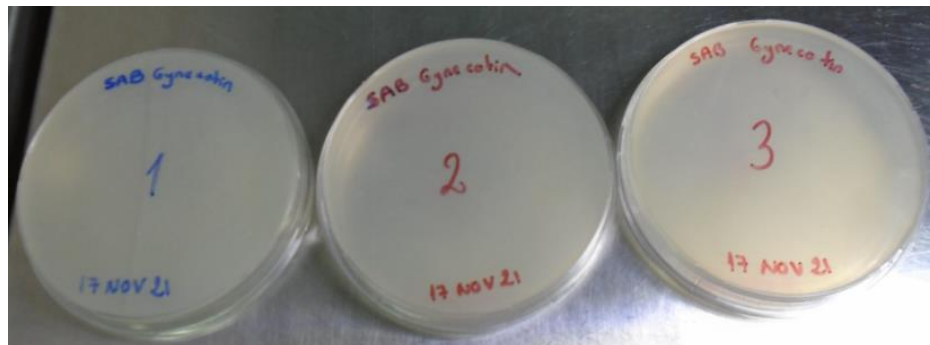
**Anexo 12:** Recuento de mohos-levaduras a los 5 días de incubación matriz sólida



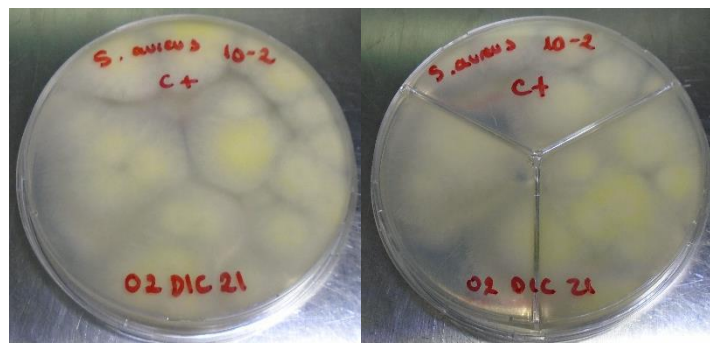
**Anexo 13:** Recuento de mohos-levaduras a los 7 días de incubación matriz sólida



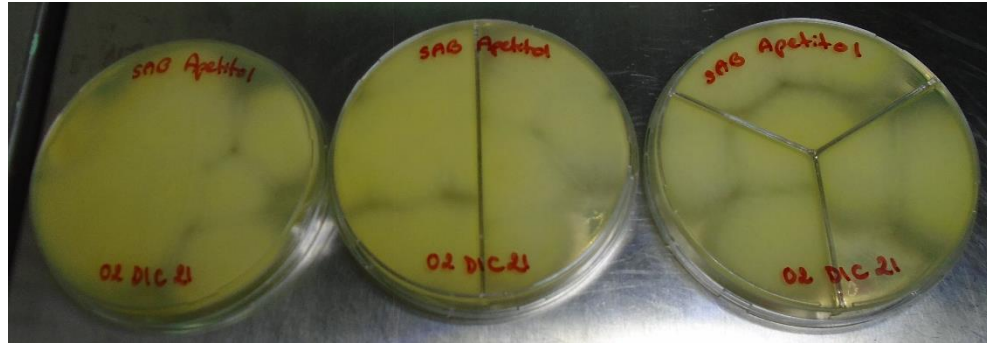
**Anexo 14:** Recuento de mohos-levaduras matriz semisólida según tiempos de incubación



**Anexo 15:** Controles positivos para recuento de mohos-levaduras según tipo de placa



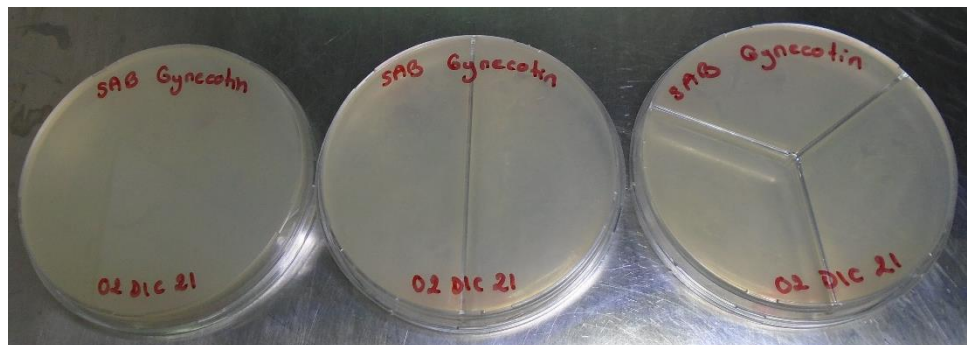
**Anexo 16:** Recuento de mohos-levaduras según el tipo de placa para matriz líquida



**Anexo 17:** Recuento de mohos-levaduras según el tipo de placa para matriz sólida

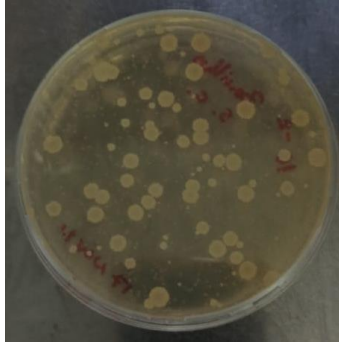


**Anexo 18:** Recuento de mohos-levaduras según el tipo de placa para matriz semisólida

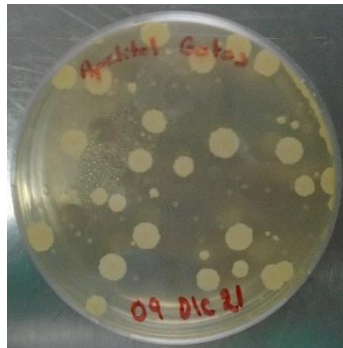




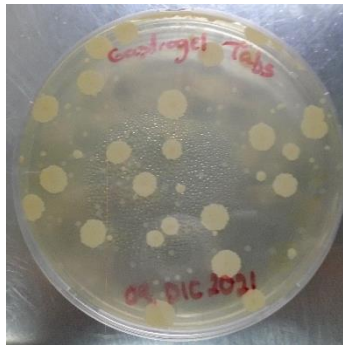
**Anexo 19:** Recuento de aerobios totales control positivo



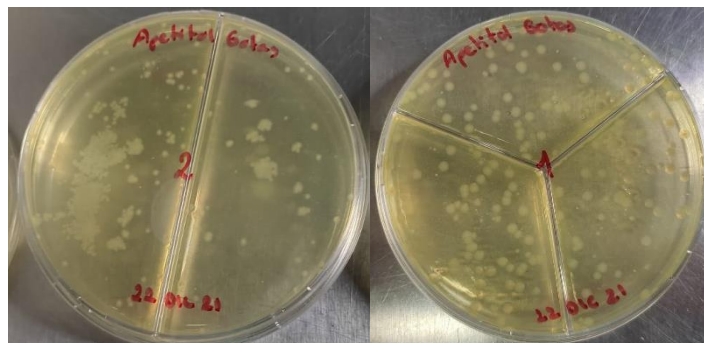
**Anexo 20:** Recuento de aerobios totales para matriz líquida



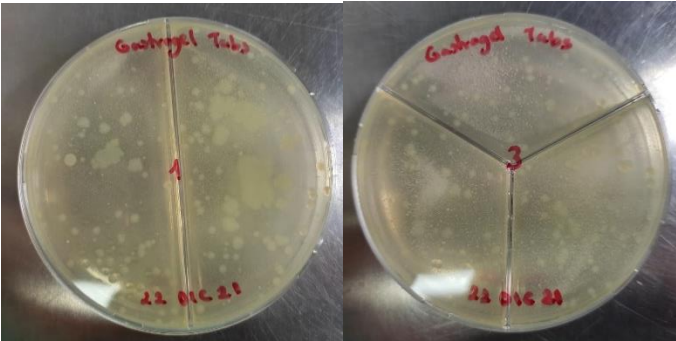
**Anexo 21:** Recuento de aerobios totales para matriz líquida



**Anexo 22:** Recuento de aerobios totales según el tipo de placa para matriz líquida



**Anexo 23:** Recuento de aerobios totales según el tipo de placa para matriz sólida



**Anexo 24:** Recuento de aerobios totales según el tipo de placa para matriz semisólida

