

Implementación de métodos microbiológicos alternativos aplicados a nutraceuticos funcionales para patología neurodegenerativa, inmunoestimulante, inmunomodulador y regeneración celular post quimioterapia y radio terapia.

¹Prada-Ramírez Harold Alexis, ¹Peña-Romero Romel, ²Raquel Gómez-Pliego y ³Humberto Zardo

¹Laboratorios Coaspharma S.A.S. Bogotá Colombia.

²Departamento de Ciencias Biológicas, Sección de Ciencias de la Salud Humana, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, C.P. 54740, México.

³School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Resumen

La disponibilidad de agua (actividad de agua A_w) en los fármacos es un factor crítico que determina la susceptibilidad de estos productos a ser contaminados por microorganismos. Así, fármacos con actividades de agua altas (cercas a 0.95) serán susceptibles a ser contaminados por bacterias, hongos y levaduras. Por el contrario, aquellas formas farmacéuticas cuya actividad de (A_w) sea inferior a 0.60 es poco probable que se contaminen por microorganismos de acuerdo con las directrices dadas por la USP capítulo 1112. La implementación de la actividad de agua como un indicador microbiológico y organoléptico está completamente inexplorada en alimentos funcionales, suplementos dietarios y nutraceuticos, que utilizan como principios activos derivados apícolas tales como embriones de abeja, jalea real, polen y propóleo. El objetivo principal de este estudio es cuantificar la actividad como una medida de control de calidad microbiológico y organoléptico en productos nutraceuticos utilizados para terapias nutrigenéticas y nutrigenómicas, en pacientes post quimioterapia.

Introducción

La nutrigenética es una ciencia aplicada guiada por la farmacología nutricional, la cual ofrece la posibilidad de personalizar la nutrición a través del uso de alimentos funcionales, suplementos dietarios y/o nutraceúticos. Así, la nutrigenética tiene en cuenta variaciones genéticas entre individuos y su respuesta clínica a nutrientes específicos ofreciendo la promesa de personalizar la nutrición en función de la constitución genética del individuo, a partir del suministro de compuestos y elementos específicos que modulen la síntesis metabólica de la célula.

A su vez, la nutrigenómica constituye una rama de la nutrigenética que pretende proporcionar un conocimiento molecular (genético) en los componentes de la dieta que contribuyen a la salud mediante la alteración de la expresión y/o estructuras, según la constitución genética del individuo. Así, por ejemplo, la nutrigenómica estudia el papel de los ácidos grasos poliinsaturados en la expresión genética de la oxidación y utilización de energía.

Los productos naturales están siendo ampliamente utilizados como alimentos funcionales gracias al alto número de moléculas bioactivas con propiedades excepcionales para la salud, lo que las ha convertido en un vehículo primordial en terapias médicas y alimenticias. Así, derivados apícolas tales como los embriones de abeja, miel, propóleo, polen y jalea real, han emergido recientemente como biorreguladores biológicos eficaces, que los convierten en principios activos esenciales para el desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas dirigidas a tratamientos terapéuticos. Gracias al amplio espectro de funciones biológicas descritas para cada uno de los derivados apícolas, la implementación de estos productos como principios activos de productos nutraceúticos, suplementos dietarios y/o alimentos funcionales, los posiciona como biorreguladores esenciales en terapias alimenticias asistidas para el mejoramiento de la salud o recuperación en pacientes post quimioterapia [1,2,3].

Así, los embriones de abeja son una excelente fuente de proteínas, incluyendo todos los aminoácidos esenciales necesarios para el cuerpo humano tales como la leucina y lisina. A su vez, los embriones de abeja contienen una variedad de ácidos grasos beneficiosos para la salud dentro de los cuales se encuentran el ácido oleico y el ácido palmítico, que son esenciales para diversas funciones corporales. Contienen vitaminas del complejo B, como B1, B2, B6, y vitamina C, esenciales para el metabolismo energético y la función inmunológica. Por tanto, teniendo en cuenta los beneficios nutricionales de los embriones de abeja gracias al alto contenido de vitaminas, ácidos grasos y aminoácidos esenciales,

los convierten en un principio activo altamente innovador en el desarrollo de nuevas formulaciones nutraceuticas para tratamientos nutrigeneticos y nutrigenomicas.

Del mismo modo, derivados apicolos como la miel, propoleo, jalea real y polen, han emergido como componentes naturales esenciales en terapias nutraceuticas y dentro de programas alimenticios asistidos, gracias su potencial antiinflamatorio, antioxidante, antimicrobiano, regenerativo, anticancerigeno, potencial probiotico y alto valor nutricional, que los convierten en herramientas esenciales de alimentos funcionales para tratar afecciones intestinales, cardiacas, circulatorias, inmunologias y neurodegenerativas.

En el presente estudio se trabajo con tres productos nutraceuticos. El primero es un sistema embrionario apicola (granulado maron) a base de embriones de abeja, jalea real, propoleo, polen y quinua. Los embriones de abeja y la jalea real se incluyeron dentro la formulacion de este alimento funcional como reconstituyentes de celulas dafias despues de quimioterapias o radioterapias. El propoleo se encarga de estimular el sistema inmunologico. El polen se incluyo dentro de la formulacion porque ofrece una fuente rica de proteinas y carbohidratos de origen vegetal con alto contenido nutricional aportando beneficios nutricionales significativos al organismo. La quinua tiene alto valor proteico de origen vegetal tambien con un alto valor energetico aprovechable para el organismo.

El segundo nutraceutico (granulado marron con aroma leve a hierbas aromaticas) analizado es un sistema apicola a base de embrión de abeja, jalea real, *Plantago ovata* (planta herbacea original del sur de Asia), *Vinca minor* (angioesperma), *Equisetum arvense* (cola de caballo). El embrión de abeja representa el principal componente de este suplemento dietario proporcionándole un alto contenido de vitaminas, acidos grasos y aminoacidos esenciales a la formulacion.

El tercer nutraceutico (polvo para suspension) analizado es un sistema apicola a base de propoleo, polen y miel. La miel se incluyó en la formulacion porque contiene una variedad de enzimas, como la glucosa oxidasa, que al reaccionar con el agua y el oxigeno libera peroxido de hidrogeno en concentraciones bajas y controladas. Este peroxido actúa como un agente antimicrobiano eficaz, eliminando bacterias y hongos sin dafiar las celulas sanas, estimulando el sistema inmunologico. El propoleo, como se menciona anteriormente tiene un alto numero de compuestos bioactivos como fenoles, flavonoides y proteinas con propiedades inmunoestimulantes. A su vez, el polen de abeja es una fuente rica en proteinas, aminoacidos esenciales, lipidos, vitaminas y minerales, lo que lo convierte en un complemento nutricional valioso.

Tal y como se describe en los capítulos generales de la USP (922 y 1112), la actividad de agua (A_w) puede ser considerada como un indicador de la estabilidad microbiológica, fisicoquímica y organoléptica de productos farmacéuticos no estériles tales como tabletas, capsulas, pastillas y materias primas solidas [4,5,12,13]. Asimismo, la actividad de agua se utiliza como una herramienta fundamental para el desarrollo de formulaciones. De este modo, actividades de agua muy por debajo de 0.75 no permiten el crecimiento de microorganismos y retardaran procesos químicos como la autohidrólisis. Actividades de agua inferiores a 0.75 son incapaces de promover el crecimiento microbiano, dado que ni los hongos más xerofílicos ni las levaduras más osmofílicas son capaces de crecer en productos con actividades de agua inferiores a 0.75. Adicional, las bacterias tanto grampositivas como gramnegativas no toleran actividades de agua inferiores a 0.89 [4,5,12,13]. Sin embargo, estudios recientes llevados a cabo en laboratorios Coaspharma, pusieron de manifiesto que el almacenamiento de las materias primas es (temperatura de 20 °C a 30 °C y humedad relativa de 30 % - 70 %) de vital importancia para garantizar niveles estables de actividad de agua durante tiempos de cuarentena [5].

El objetivo principal de esta investigación es llevar a cabo una valoración microbiológica y organoléptica de nutraceúticos a base de embriones de abeja, jalea real, polen y propóleo a través de la cuantificación de la actividad de agua utilizando el método validado de punto de rocío espejo enfriado aprobado por el ente regulador colombiano (INVIMA). De este modo, incluir entro de los análisis rutinarios llevados a cabo en la industria farmacéuticas, la cuantificación de la actividad de agua como una prueba microbiológica y organoléptica para valorar la calidad de estos alimentos funcionales que se utilizará para el desarrollo de terapias nutrigenómicas y nutrigenéticas.

Materiales y Métodos

(a) Reactivos

Se utilizaron estándares de sales saturada con actividades de agua conocidas para construir la curva de calibración, y determinar el rango operativo y la linealidad del método de punto de rocío espejo enfriado. Se utilizaron cloruro de litio 13,41 mol/kg +/- 0,5% $a_w = 0,25$, cloruro de litio 8,57 mol/Kg +/- 0,5% $a_w = 0,50$, cloruro de sodio 6,0 mol/Kg +/- 0,5% $a_w = 0,76$, cloruro de sodio 2,33 mol/Kg +/- 0,5% $a_w = 0,92$, y agua destilada $a_w = 1,00 +/- 0,003$.

Los nutracéuticos apícolas en presentación polvo para suspensión a base de embriones de abeja, jalea real, polen, miel y propóleo fueron suministrados por Vital Healthy Solution S.A.S. aliado de Laboratorios Coaspharma S.A.S, Bogotá, Colombia.

(b) Aqualab 4TE

Aqualab 4 TE, instrumento utilizado para cuantificar la actividad de agua por el método de punto de rocío espejo enfriado. El sistema incluye instrumento de punto de rocío, con un cámara de medición de temperatura precisa, software Skala control para llevar cabo todas las funciones administrativas tales como la identificación de las muestras. El software Skala control almacena los datos primarios referente a las medidas de actividad del agua en el Amazon Web Site (AWS). El software Skala Control cumple con CFR 21 apartado 11, garantizando la integridad y confidencialidad de los datos. El diseño calificación (DQ), calificación de instalación (IQ), calificación operativa (OQ), validación de software (SV) y la calificación de desempeño (PQ) del sistema fueron cumplidas satisfactoriamente, según lineamientos de PDA.

(c) Cuantificación de la actividad de agua

La cuantificación de la actividad de agua se llevó a cabo para los tres sistemas apícolas nutraceúticos. El criterio de aceptabilidad para la actividad de agua que se usó fue $aw < 0.75$. Para las mediciones de actividad de agua se dio uso del equipo AQUALAB 4TE WATER ACTIVITY METER. Para la medición rutinaria de actividad de agua se procedió a realizar verificaciones antes de su uso utilizando los estándares de 0.25 y 0.76. El equipo previamente fue calibrado utilizando los estándares de sales saturadas de 0.25, 0.50, 0.76, 0.92 y agua destilada, acorde con lo establecido en el capítulo 922 de la USP.

(d) Pruebas microbiológicas y organolépticas

Para los tres sistemas apícolas nutraceúticos a base de embrión de abeja, jalea real, propóleo, polen y miel, se les realizaron pruebas microbiológicas y organolépticas “aspecto, color y olor”. Para los análisis microbiológicos se realizaron análisis de mesófilos, hongos y levaduras, usando los métodos

convencionales como la siembra directa en placas de acuerdo a las directrices de los capítulos generales de la USP <61 y 62>. Para los tres nutraceuticos se realizaron pruebas de aptitud del método con e propósito de neutralizar cualquier efecto antimicrobiano y poder recuperar microorganismos. De este modo, Se neutralizan químicamente los preservantes de los PT analizados para obtener una determinación microbiológica exitosa. De este modo, se agregaron 10 g del respectivo producto farmacéutico en 90 mL de caldo CASOY en presencia del agente neutralizante seleccionado (Tween®80). Para la determinación de presencia o ausencia de *Pseudomonas aureginosa* se utilizó el medio selectivo Cetrimide. Para la determinación de presencia o ausencia de Salmollena se utilizó el caldo *Rappaport* como medio enriquecedor y agar selectivo XLD (desoxicolato de xilosa y lisina. Para la determinación de *Staphylococcus aureus* se utilizo medio selectivo agar manitol salado. Para la determinación de *Escherichia coli* se utilizo caldo enriqueco McConkey y agar selectivo McConkey. El conteo total de hongos y levaduras se llevo a cabo utilizando el agar Saboraud. El conteo total de mesófilos totales se llevo a cabo utilizando agar caseína y soya. Las pruebas microbiológicas y organolépticas se llevaron a cabo en paralelo y en simultaneo con la cuantificación de la actividad de agua.

Resultados y Discusión

La disponibilidad de agua (actividad de agua A_w) en las formas farmacéuticas es un factor crítico que determina la susceptibilidad de estos productos a ser contaminados por microorganismos. Así, fármacos con actividades de agua altas (cercanas a 0.95) serán susceptibles a ser contaminados por bacterias, hongos y levaduras. Por el contrario, formas farmacéuticas cuya actividad de (A_w) sea inferior a 0.60 es poco probable que se contaminen por microorganismos de acuerdo con las directrices dadas por la USP capítulo 1112. Así, ni siquiera las levaduras más osmofílicas o los hongos filamentosos más xerofílicos podrían proliferar por debajo de 0.60. Por tanto, la cuantificación de la actividad de agua en los fármacos, se puede considerar una medida directa de la carga microbiológica del producto sin necesidad de hacer un análisis microbiológico directo al producto por los métodos farmacopeicos tradicionales siempre y cuando la cuantificación de la actividad de agua se encuentre de una matriz de riesgo que ponga en consideración los análisis históricos microbiológicos del producto y la validación del proceso.

De este modo, los fármacos con actividades de agua inferiores a 0.60 (tabletas de compresión directa, capsulas rellenas de líquido, cápsulas rellenas de polvo, productos líquidos no acuosos, supositorios rectales y ungüentos), serían excelentes candidatos para reducir el análisis microbiológico rutinario. Así, la cuantificación de la actividad de agua, acompañada por un histórico microbiológico del producto terminado y del producto terminado en el mercado (al menos los 20 últimos lotes cumplen con las especificaciones microbiológicas), un histórico microbiológico del envase primario cuyos últimos 20 lotes cumplan con las especificaciones microbiológicas o se tenga un acuerdo de calidad con proveedor que garantice los microbiológicos del envase primario, adicionalmente, si el producto cuenta con una validación tanto de proceso de fabricación como de limpieza serán argumentos de peso para esgrimir frente a un ente regulador para justificar el análisis microbiológico por monitoreo (cada 20 lotes o 4 meses, por ejemplo).

Actualmente, no existe literatura que muestre los niveles de actividad de agua en nutraceúticos o alimentos funcionales para terapias nutrigenéticas y nutrigenómicas para tratamientos neurodegenerativos, inmunoestimulantes y post quimioterapias. Del mismo modo, no existe literaria que relacione los niveles de actividad de agua con características microbiológicas ni organolépticas. Por tanto, se cuantifico la actividad de agua por el método de punto de rocío espejo enfriado de los nutraceúticos: *sistema embrionario apícola (polvo para suspensión) a base de embriones de abeja, jalea real, propóleo, polen y quinua; sistema apícola a base de embrión de abeja, jalea real, Plantago ovata (planta herbácea original del sur de Asia), Vinca minor (angiosperma), Equisetum arvense (cola de caballo); sistema apícola a base de propóleo, polen y miel.*

Utilizando el método de punto de rocío espejo enfriado previamente validado y certificado por el ente regulador INVIMA (*Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos*), se cuantifico los niveles de actividad de agua de los tres sistemas apícolas nutraceúticos (Tabla 1). Para cada uno de los sistemas apícolas nutraceúticos evaluados se tomaron tres replicas independientes de actividad de agua. Simultáneamente, se llevaron a cabo pruebas organolépticas (olor, color y apariencia) y microbiológicas utilizando los métodos tradicionales de conteo en placa para recuento de mesófilos, hongos y levaduras de acuerdo a las directrices de los capítulos generales de la USP <61 y 62>. A su vez, se determino la presencia/ausencia de patógenos objetables como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*.

Sistema apícola a base de embriones de abeja, jalea real, propóleo, polen y quinua (regeneración celular post quimioterapia y radio terapia) presento niveles de actividad bajos ($A_w=0.3913$, $n=3$), A niveles de actividad de agua inferiores a 0.60, ni los hongos más xerofíticos ni las levaduras más osmofílicas pueden crecer. En consonancia con niveles de actividad agua baja, el recuento de mesófilos, hongos y levaduras presento resultados dentro de especificación (< 10 ufc/g, Table 2). No se detectó presencia de patógenos objetables como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* (Table 2).

Nutracéutico a base de embrión de abeja, jalea real, *Plantago ovata*, *Vinca minor*, *Equisetum* (nutracéutico funcional para patología neurodegenerativa) presento niveles de actividad bajos ($A_w=0.4117$, $n=3$), Estos niveles de actividad de agua no permiten albergar el crecimiento microbiológico. En consonancia con niveles de actividad agua baja, el recuento de mesófilos, hongos y levaduras presento resultados dentro de especificación (< 10 ufc/g, Table 2). No se detectó presencia de patógenos objetables como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* (Table 2).

ACTIVIDAD DE AGUA (A_w) DE NUTRACEÚTICOS			
	Sistema apícola a base de embriones de abeja, jalea real, propóleo, polen y quinua. (regeneración celular post quimioterapia y radio terapia)	Nutracéutico a base de embrión de abeja, jalea real, <i>Plantago ovata</i> , <i>Vinca minor</i> , <i>Equisetum</i> (nutracéutico funcional para patología neurodegenerativa)	Sistema apícola a base de propóleo, polen y miel. (Inmunomodulador)
	0.4094	0.4164	0.3597
	0.3875	0.4205	0.3580
	0.3770	0.4164	0.3567
Promedio (A_w)	0.3913	0.4117	0.3581
Desviación estándar	0.0165	0.0023	0.0015
Coefficiente de variación	4.2246	0.5666	0.4200

Tabla 1. Actividad de agua de nutraceuticos funcionales para patología neurodegenerativa, inmunoestimulante, inmunomodulador y regeneración celular post quimioterapia y radio terapia. Los CV < 5 % para los tres sistemas apícolas nutraceuticos evaluados son excelentes.

Por último, el sistema apícola a base de propóleo, polen y miel (Inmunomodulador) presento niveles de actividad de agua bastante bajos ($A_w=0.3581$, Table 1). A niveles de actividad de agua inferiores a 0.60, ni los hongos más xerofíticos ni las levaduras más osmofílicas pueden crecer. En consonancia con niveles de actividad agua baja, el recuento de mesófilos, hongos y levaduras presento resultados

dentro de especificación (< 10 ufc/g, Table 2). A su vez, el polen solido presento ausencia de patógenos tales como *E. coli*, *Paeruginosa* y *S. aureus* (Tabla 2).

Nutraceuticos	Organolépticos	Conteo de mesófilos aerobios	Hongos y Levaduras	Patógenos
Sistema apícola a base de embriones de abeja, jalea real, propóleo, polen y quinua. (regeneración celular post quimioterapia y radio terapia)	Granulado marrón	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	Ausentes
Nutraceutico a base de embrión de abeja, jalea real, <i>Plantago ovata</i> , <i>Vinca minor</i> , <i>Equisetum</i> (nutraceutico funcional para patologia neurodegenerativa)	Granulado marrón	< 10 ufc/mL	< 10 ufc/mL	Ausentes
Sistema apícola a base de propóleo, polen y miel. (Inmunomodulador)	Polvo para suspensión amarillo palido	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g	Ausentes

Tabla 2. Recuento microbiológico y características organolépticas de los nutraceuticos analizados.

Tal y como se ha discutido en los capitulos generales de la USP <1112> “*Cuantificación de actividad de agua en productos farmacéuticos no estériles*”, las formas farmacéuticas solidas como polvos, granulados, pulverizados, tabletas, pastillas y capsulas, no son susceptibles a tener crecimiento microbiológico ya que presentan actividades de agua inferiores 0.50. Los resultados para los tres sistemas apícolas nutraceuticos evaluados pusieron de manifiesto que la forma farmacéutica de polvo para suspensión presenta actividades de agua incluso inferiores a 0.42.

A su vez, los derivados apícolas utilizados como principios activos de los nutraceuticos tales como la jalea real, miel, propóleo y polen solido han sido ampliamente reconocidos por tener una actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de bacterias, hongos y levaduras. Estos atributos biológicos inherentes a cada biorregulador apícola permite un efecto de autopreservación evitando el daño de la materia prima a causa de crecimiento microbiano. Este efecto auto preservante facilita el uso de los derivados apícolas para hacer parte de nuevas formulaciones con fines nutraceuticos. De hecho, su efecto preservante es tan importante que se ha propuesto para remplazar preservantes como los parabenos [3,9].

La actividad de agua es reconocida como una medida de calidad de productos alimenticios y farmacéuticos. Sin embargo, su implementación como una herramienta predictiva de la carga microbiológica de productos farmacéuticos solidos no estériles tiene que estar acompañada o

respaldada por históricos microbiológicos de los últimos 20 lotes del producto terminado y del producto terminado liberado al mercado, materias primas y envase primario. A su vez, la regulación farmacéutica exige la validación de los procesos de manufactura y auditorías a proveedores para garantizar que todas estas aristas se encuentren alineadas con actividades de agua inferiores a 0.75.

Por tanto, la cuantificación de la actividad de agua como una herramienta predictiva de la carga microbiológica puede ser aplicable únicamente a aquellos nutraceuticos apícolas que tengan actividades de agua iguales o inferiores a 0.60. Por tanto, la cuantificación de la actividad de agua por el método farmacopeico validado de punto de rocío espejo enfriado puede ser aplicable para los tres sistemas apícolas nutraceuticos evaluados (regeneración celular, Inmunomodulador y neuroestimulante). Del mismo modo, los resultados microbiológicos (<10ufc/g) para los tres nutraceuticos respaldan la hipótesis que la actividad de agua puede ser considerada como un indicador de la carga microbiológica de nutraceuticos granulados y pulverizados.

Teniendo en cuenta que laboratorios Coaspharma actualmente cuenta con la certificación por parte del ente regulador Invima para utilizar la cuantificación de actividad de agua "*método de punto de rocío espejo enfriado*" como una medida directa de la carga microbiológica de formas farmacéuticas sólidas para la liberación de producto al mercado, el presente estudio propone incluir también la cuantificación de la actividad de agua como una herramienta para predecir la carga microbiológica de sistemas apícolas nutraceuticos. Sin embargo, tal y como lo define la USP en sus capítulos generales, es de vital importancia realizar un análisis de riesgo que incluya históricos microbiológicos, actividades de agua inferiores a 0.60, estandarización de los envases primarios del producto terminado, validación del proceso de manufactura del nutraceutico y una revisión bibliográfica que ponga de manifiesto el potencial antimicrobiano de las materias primas que constituyen el nutraceutico final.

Conclusión

En la actualidad en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica, la actividad de agua es considerada como un indicador de inocuidad microbiológica y de vida útil para múltiples productos. Sin embargo, la implementación como herramienta predictiva de la carga microbiológica de productos biológicos tales como los embriones de abeja, miel, propóleo, jalea real y polen sólido, está completamente inexplorada. Así, la presente investigación toma una especial relevancia científica en

donde se documenta la relación de la actividad de agua y la carga microbiológica (utilizando métodos farmacopeicos de referencia de conteo en placa) en productos derivados apícolas con fines alimenticios para terapias nutrigenómicas.

Los resultados de actividad de agua obtenidos para los tres sistemas apícolas nutraceuticos a base de embriones de abeja, jalea real, propóleo, miel y polen, indican que las formas farmacéuticas granuladas y pulverizadas tienen actividades de agua inferiores a 0.50. Así, la implementación de la cuantificación de la actividad de agua por el método de punto de rocío espejo enfriado como herramienta para predecir la carga microbiológica de productos apícolas solo puede ser aplicable al para los tres nutraceuticos destinados para la regeneración celular, neuroregenerador e inmunoestimulante. En soporte con esta idea, no se observaron recuentos microbiológicos dentro de especificación microbiológica para estos suplementos alimenticios (<10 ufc/g, mesófilos, hongos y levaduras). No se detectó presencia de patógenos objetables como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, de acuerdo con el capítulo general de la USP <1112> las formas farmacéuticas solidas pueden ser analizadas por el método de punto de rocío espejo enfriado para determinar la carga microbiológica a través del uso de una matriz de riesgo. Esto puede ser aplicable para el análisis de nutraceuticos solidos como los analizados en el presente estudio.

Referencias

1. Fuliang HU, Hepburn HR, Xuan H, Chen M, Daya S, Radloff SE. H. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. *Pharmacol Res.* 2005; 51(2):147-52.
2. Collazo N, Carpena M, Nuñez-Estevez B, Otero P, Simal-Gandara J, Prieto MA. Health Promoting Properties of Bee Royal Jelly: Food of the Queens. *Nutrients.* 2021 Feb 7;13(2):543.
3. Diana Marcela Buitrago, Sandra J. Perdomo, Francisco Arturo Silva, Willy Cely-Veloza and Gloria Inés Lafaurie Physicochemical Characterization, Antioxidant, and Proliferative Activity of Colombian Propolis Extracts: A Comparative Study. *Molecules* (2024). 6;29(7):1643. DOI: 10.3390/molecules29071643

4. Prada-Ramírez HA, J Jurado-Ramos, and C Fonseca. Validation of the dew point chilled mirror method for the measurement of water activity on solid pharmaceutical products, testing the effect of different temperatures, sample preparations, and environment exposure times. *RPS Pharmacy and Pharmacology Reports* (2024) 3 (1),1-8.
5. Prada-Ramírez HA, E Rico-Jiménez, J Jurado-Ramos, and C Fonseca. Stability study through water activity measurements for dispensed powdered raw. *J AOAC Int* (2024) 107(3):487-492.
6. Prada-Ramírez HA. Review on Enforcement of Alternative Microbiological Method in the Pharmaceutical Industry. *Sys Rev in Pharm* (2023)14 (10) 616-621.
7. Prada-Ramírez HA, A Beltran, S Celeita, and C Fonseca. Performance equivalence and validation of a rapid microbiological method for detection and quantification of yeasts and molds in an antacid oral suspension. (2023) *PDA J Phar Sci Technol.* (2023) 77 (4) 268-280.
8. Prada-Ramírez HA, S Celeita, and J Fonseca. Validation of a rapid microbiological method for the detection and quantification of *Burkholderia cepacia* complex in an antacid oral suspension. *J AOAC Int* (2023)106(5), 1288–1294.
9. Prada- Ramírez HA, S Celeita, andJ Fonseca. Efficacy comparison of an automated growth based system and plate-count-method on the detection of yeasts and molds in personal care products. *J AOAC Int* (2023) 106(6), 1564–1573.
10. López J, Ubillos M. 2004. Estandarización del propóleo de la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco (Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial. Tesis, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
11. Lee SW, Jo SK. 2011. WPSF Actividades y Propuestas para la estandarización Internacional de los Propóleos. Apimondia 2011 Resúmenes, 28.
12. *United State Pharmacopeia Convention 42* (2021) Rockville, MD, Chapter 922.
13. *United State Pharmacopeia Convention 42* (2021) Rockville, MD, Chapter 1112