



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN



27  
2010

EFICIENCIA DE DESINFECTANTES COMERCIALES  
RECOMENDADOS PARA LA DESINFECCION  
DE FRUTAS Y VERDURAS

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
P R E S E N T A  
**MA. EUGENIA JIMENEZ CRUZ**  
ASESOR: M.C. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de

Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Leballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, permitimos comunicarle a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Eficiencia de Desinfectantes Comerciales Recomendados

para la Desinfección de Frutas y Verduras.

que presenta la pasante: María Eugenia Jiménez Cruz

con número de cuenta: 8653058-9 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 18 de Agosto de 1994

PRESIDENTE

M. en C. Clara I. Alvarez Manrique

VOCAL

Q.F.B. Leticia Zóñiga Ramírez

SECRETARIO

Q.F.B. Patricia Zóñiga Cruz

PRIMER SUPLENTE

Q.F.B. Virginia Oliva Arellano

SEGUNDO SUPLENTE

Q.F.B. Marina L. Morales Galicia

## DEDICATORIAS

DEDICO ESTA TESIS A:

**MIS PADRES: EDUARDO JIMENEZ PAREDES Y FRANCISCA CRUZ DE JIMENEZ**

CON TODO MI CARIÑO Y RESPETO, DANDOLES GRACIAS POR TODO EL APOYO Y CARIÑO QUE ME HAN BRINDADO A TRAVES DE MI VIDA, PORQUE HAN SABIDO SER BUENOS GUIAS; CONOCEN EL SIGNIFICADO DE SER PADRES Y LO HAN SABIDO SER; Y SIEMPRE SERAN PARA MI LOS MEJORES PADRES.

**MI ESPOSO: ING. ALBERTO AYALA OVIEDO**

CON TODO MI AMOR, PORQUE HA SABIDO SER COMPAÑERO Y AMIGO, BRINDANDOME SIEMPRE LO MEJOR DE EL EN TODO MOMENTO; ME HA DADO SU APOYO Y AMOR INCONDICIONAL SIEMPRE; HA SIDO MI BRAZO FUERTE CUANDO LE HE NECESITADO Y SEGUIRA SIENDO POR SIEMPRE MI AMOR LIMPIO E INCONDICIONAL.

**MI HIJO: JORGE ALBERTO AYALA JIMENEZ**

CON TODO EL AMOR DULCE DE MADRE QUE HA DESPERTADO EN MI CON SU TERNURA E INOCENCIA, PORQUE ES EL TESORO MAS GRANDE QUE POSEO, QUE SIEMPRE ME DA FUERZA PARA SEGUIR ADELANTE Y POR LA INMENSA FELICIDAD QUE HA TRAIIDO A MI VIDA.

TE QUIERO MUCHO HIJO

**MIS HERMANOS:**

CON TODO MI CARIÑO DE SIEMPRE, POR EL APOYO Y CARIÑO QUE ME HAN BRINDADO, PORQUE SON BUENOS HERMANOS Y SE QUE SIEMPRE CONTARE CON USTEDES.

## A G R A D E C I M I E N T O S

A TODAS LAS PERSONAS QUE HICIERON POSIBLE LA REALIZACION DE ESTA TESIS, CON SU APOYO Y COMPRESION:

M.C. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE

PORQUE MAS QUE ASESOR FUE EN REALIDAD AMIGA Y CONFIDENTE.

M.C. A. VIRGINIA LARA SAGAHON

POR SU AYUDA EN EL ANALISIS ESTADISTICO DE ESTE TRABAJO.

SECCION DE ANALITICA

POR SU AMABLE APOYO DURANTE LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

Y PRINCIPALMENTE DOY GRACIAS A DIOS POR LA VIDA QUE ME HA PRESTADO Y PORQUE HA COLOCADO A MI ALREDEDOR A MUCHAS PERSONAS QUERIDAS PARA MI; GRACIAS A EL HE REALIZADO TODAS LAS METAS FIJADAS HASTA HOY Y SE QUE SIEMPRE ESTARA CONMIGO Y CON MI FAMILIA.

# I N D I C E

RESUMEN .....	I-III
INTRODUCCION .....	1
1. FACTORES DE CONTAMINACION .....	1
2. MEDIDAS DE PREVENCION .....	4
3. INDICADORES DE CONTAMINACION .....	5
4. COLIFORMES .....	7
5. DESINFECTANTES .....	9
6. CLORO .....	10
7. DIOXIDO DE CLORO .....	22
8. PLATA .....	24
OBJETIVOS .....	29
PLAN DE TRABAJO .....	30
MATERIAL Y METODOS .....	33
1. MUESTRAS BIOLÓGICAS .....	33
2. DESINFECTANTES .....	33
1. TOMA DE MUESTRAS .....	33
2. ANALISIS BACTERIOLOGICO .....	34
3. EVALUACION DE LA INTERFERENCIA VEGETAL .....	39
4. DETERMINACION DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS PRESENTES EN CADA DESINFECTANTE .....	40
5. ANALISIS ESTADISTICO .....	42

RESULTADOS .....	43
1. ANALISIS BACTERIOLOGICO REALIZADO EN LECHUGA ..	43
2. ANALISIS BACTERIOLOGICO REALIZADO EN MEDIO ACUOSO A UN CULTIVO DE <u>E. coli</u> Fecal .....	51
3. EVALUACION DE LA INTERFERENCIA VEGETAL .....	52
4. CUANTIFICACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS .....	59
DISCUSION .....	61
CONCLUSIONES .....	69
ANEXOS .....	71
BIBLIOGRAFIA .....	73

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la eficiencia de desinfectantes a base de compuestos clorados y a base de plata coloidal, de uso doméstico más frecuente, y disponibles en el mercado.

Los desinfectantes se evaluaron frente a Coliformes presentes en lechuga variedad romana, que es la hortaliza de mayor consumo en crudo.

El estudio se llevó a cabo a los tiempos y dosis recomendados por el fabricante, lavando previamente la lechuga con agua de la llave simulando un tratamiento doméstico.

El número de microorganismos con y sin tratamiento de desinfectantes se calculó por el método del Número Más Probable.

Además se realizó una prueba in vitro, enfrentando a los desinfectantes a E. coli fecal en agua destilada estéril, usando tiempos y dosis recomendadas por el fabricante para la desinfección de agua y constatar así la interferencia de material orgánico en la acción desinfectante.

Se realizó también la determinación de cloro disponible en los desinfectantes a base de compuestos clorados por el método yodométrico y la determinación de plata en el desinfectante a base de plata coloidal por el método directo según Volhard.

Los datos obtenidos del Análisis Bacteriológico realizado a cinco lechugas variedad romana y a E. coli Fecal en medio acuoso a concentración conocida se trabajaron Estadísticamente por: Análisis de Covarianza; Análisis de Rango Múltiple por el Método de Tukey con un nivel de significancia del 5% y por Contraste Lineal con un nivel de significancia del 5%.

Y dos de los datos del Análisis Bacteriológico realizado en Lechuga, tomados al azar, junto con los datos del Análisis Bacteriológico realizado a E. coli Fecal en medio acuoso, se trabajaron Estadísticamente por: Análisis de Covarianza y Análisis de Rango Múltiple por el Método de Tukey con un nivel de significancia del 5%.

Encontrándose que: la diferencia principal está entre los desinfectantes clorados I y III, siendo más eficiente el I, frente a las hojas de lechuga.

Al comparar los desinfectantes a base de compuestos clorados y el desinfectante a base de plata coloidal frente a las hojas de lechuga no hubo ninguna diferencia.

Frente a E. coli Fecal en medio acuoso los desinfectantes I y IV fueron realmente eficientes, no siendo así para los desinfectantes II y III.

Existiendo además diferencia entre los desinfectantes al actuar cuando está presente la Lechuga y cuando el medio es sólo acuoso.

Se practicaron análisis cuantitativos a los desinfectantes por los Métodos Yodimétrico y Directo según Volhar y de los cuatro desinfectantes el único que presentó la concentración de principio activo descrita en el envase fue el desinfectante a base de plata coloidal.

## INTRODUCCION

La microflora superficial de los vegetales varía con la planta, pero generalmente está formada por especies de Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Micrococcus y bacterias coliformes y lácticas. Las bacterias lácticas incluyen Lactobacillus brevis y Lactobacillus plantarum, Leuconostoc mesenteroides y Leuconostoc dextranicum, Streptococcus faecium y Streptococcus fecalis. También se encuentran especies de Bacillus, levaduras y otros hongos. El número de bacterias depende también de las plantas y del medio en que se encuentran, variando entre unos pocos cientos o miles por centímetro cuadrado de superficie a varios millones. (10)

Las especies de Pseudomonas predominan más en las hortalizas, ya que son encontradas en tomates, rábanos, apio, zanahoria, endivias, col, pepinos, cebollas, lechuga. Siendo las hortalizas crudas fuente de contaminación. (10)

### 1. Factores de Contaminación

La carga microbiana de los vegetales frescos está influenciada por numerosos factores, entre los cuales cabría citar, por sus repercusiones sanitarias.

1.1 El Agua: es una fuente potencial de contaminación. La lluvia contiene microorganismos tomados del aire. Cuando la lluvia incide contra suelo, la contaminación de que es objeto por los organismos presentes en él se suma a la que ya poseía. (11,4)

Los géneros de bacterias que suelen formar parte de la flora "normal" del agua son Pseudomonas, Flavobacterium, Cytophaga, Acinetobacter, Moraxella, Aeromonas, Corynebacterium, Klebsiella, Alcaligenes, Bacillus, Micrococcus, Streptococcus, Enterobacter y Escherichia. Estos tres últimos son posiblemente contaminantes y no forman parte de su flora natural. (4, 10)

Los virus que se encuentran en el agua y los efluentes naturales; pueden adherirse a las partículas en suspensión y retener su infectividad. (4)

Si el agua de riego se halla contaminada o proviene en parte o en su totalidad de la red colectora de aguas residuales, los productos recolectados pueden ser peligrosos para la salud. (4)

Las hortalizas pueden ser enfriadas al procederse a su recolección. El agua utilizada con éste fin, a menudo contaminada por efluentes residuales o desechos humanos, actúa como inculador de varios microorganismos, que se distribuyen en el vegetal desde las zonas más externas hasta las escondidas. (4)

Ya que la mayoría de las frutas y verduras se consumen crudas, el empleo de agua no tratada para el lavado de éstos alimentos puede servir de vehículo de transmisión de los organismos patógenos. (4)

1.2 Fertilizantes Orgánicos no Depurados es otro factor que afecta la carga microbiana de los vegetales con bacterias patógenas para el hombre, especialmente de aquellas que causan enfermedades gastrointestinales. Aparte de los gérmenes patógenos, los alimentos pueden también contaminarse con coliformes, anaerobios y otras bacterias intestinales no patógenas. (11, 10)

Cuando los desechos animales o humanos son utilizados como abono, los patógenos de estas fuentes pueden contaminar la planta y sus derivados, ya que al consumirse crudas dan lugar a enfermedades de tipo alimentario. (4)

1.3 El Suelo es otra fuente de contaminación de vegetales, ya que contiene la mayor fuente de microorganismos y en gran cantidad. De especial interés son los mohos, las levaduras y las especies bacterianas siguientes: Bacillus, Clostridium, Enterobacter, Escherichia, Micrococcus, Alcaligenes, Flavobacterium, Chromobacterium, Pseudomonas, Proteus, Streptococcus, Leuconostoc y Acetobacter. (10)

1.4 La Manipulación a que son sometidos los vegetales trae como consecuencia mayor carga bacteriana, la recolección mecánica ha aumentado la contaminación, así como los daños causados en frutas y hortalizas.

1.5 La Contaminación adicional puede provenir del equipo empleado, materiales de empaquetado y del personal. (4, 10)

1.6 Los PAJAROS e INSECTOS producen lesiones mecánicas en las frutas y hortalizas por las que penetran los microorganismos y se facilita la contaminación microbiana. (10)

1.7 El Aire, algunos microorganismos pueden llegar a los alimentos por medio del AIRE, principalmente aquellos que ocasionan enfermedades de tipo respiratorio.

Concomitante con éstas vías de entrada del microorganismo patógeno en el vegetal, un factor que interviene en el grado de contaminación, es el tiempo de supervivencia de muchos de ellos. Condicionado por numerosos factores (luz solar, humedad, textura y tipo de suelo, sistema de riego, etc), se ha comprobado que para algunas bacterias -Salmonella- oscila de 7 a 40 días sobre vegetales y alrededor de 40 días sobre la superficie del suelo; en Coliformes dicho tiempo se sitúa próximo a los 38 días en ambos casos, lo que de cualquier modo supera la vida útil del producto. (12)

Por todas estas razones el agua sigue siendo el principal portador de los organismos causantes de la gastroenteritis humana. (4)

## 2. Medidas de Prevención

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó varias prácticas higiénicas para las frutas y hortalizas. La desinfección ambiental cuando los vegetales están en la fase de crecimiento incluye: la eliminación en condiciones higiénicas de los productos residuales animales y humanos; impone la calidad en el agua de irrigación y el control de los roedores, parásitos y enfermedades. (4)

Los aspectos higiénicos de la cosecha incluyen: limpieza y cuidado del material y de los recipientes para que no sean fuente de microorganismos. Los productos impropios para el consumo deben separarse y eliminarse de manera satisfactoria. El producto obtenido debe ser protegido contra la contaminación por los animales, insectos, pájaros, productos químicos o microorganismos. (4)

El transporte de los productos debe efectuarse en camiones o vagones aireados y de fácil limpieza. Toda forma de mantenimiento debe realizarse con el máximo cuidado, y cuando se requiera se recurrirá a la refrigeración en cámara o con hielo esterilizado. (4)

### 3. Indicadores de Contaminación

La contaminación de los productos vegetales por los microorganismos del suelo es muy importante para el tratamiento industrial, puesto que los suelos contienen esporas bacterianas, entre las cuáles se encuentran las de Clostridium botulinum. Las esporas bacterianas resisten los agentes desinfectantes así como los tratamientos de preservación de alimentos. (4)

Los vegetales son atacados por microorganismos patógenos especialmente intestinales y su detección es poco práctica y costosa, debido a que: (33,26)

-No siempre están presentes en la fuente de contaminación (materia fecal), pero pueden aparecer repentinamente. (26)

-Al diluirse la contaminación en el agua, pueden quedar en concentraciones no detectables por los métodos de laboratorio. (26)

-Sobreviven relativamente poco tiempo en el agua, por lo que pueden desaparecer antes de ser detectados. (26)

-Los resultados del análisis bacteriológico del agua se obtienen después de que ésta ha sido consumida, por lo cual, si hay patógenos, la población ya habrá estado expuesta a la infección. (26)

Esto hace indispensable una medida de control más efectiva, como es la detección del peligro potencial; es decir, la advertencia del riesgo de contaminación con microorganismos patógenos; por lo que se utilizan "indicadores de contaminación", que reúnen las siguientes características: (26)

a) Se encuentran como flora normal en la fuente de contaminación, es decir, en la materia fecal, independientemente de que haya o no microorganismos patógenos. (26)

b) Son más resistentes y sobreviven en el agua más tiempo que los patógenos. (26)

c) Su detección en el laboratorio es relativamente rápida, fácil y confiable. (26)

#### 4. Coliformes

Las bacterias coliformes reúnen las características anteriores, ya que se encuentran en grandes cantidades en el tracto intestinal del hombre y de los mamíferos, y por lo tanto en sus heces. (26)

La sobrevivencia de los coliformes en el agua es mayor que la de cualquier bacteria patógena y su identificación es fácil y confiable. (26)

Escherichia coli es un germen cuyo habitat natural es el tracto digestivo del hombre y de otros animales de sangre caliente. La presencia de éste microorganismo, en un alimento se interpreta generalmente como contaminación directa o indirecta de origen fecal. Por ello E. coli es el indicador clásico de la presencia simultánea de bacterias patógenas entéricas, entre ellas Salmonella typhi, otras salmonelas, shigelas, vibrios, entamoebas, parásitos diversos, agentes de zoonosis y virus entéricos. (33)

Es común la determinación de gérmenes coliformes, que incluyen E. coli, en pruebas preliminares. Si de estas pruebas iniciales se deduce la posibilidad de contaminación fecal, los coliformes se someten a otros ensayos para determinar si entre ellos está presente E. coli. (33)

Los coliformes comprenden todos aquellos bacilos no formadores de esporas, gramnegativos, aeróbicos o facultativamente anaeróbicos, que fermentan la lactosa con formación de gas antes de 48 horas a 35°C, que producen colonias sobre agar de eosina-azul de metileno, las cuáles presentan un brillo metálico de color verde amarillento antes de las 24 h de incubación a 35-37°C. (4)

Con los procedimientos habituales de la U. S. FDA (1976) la definición de un presunto coliforme corresponde a un microorganismo que produce gas en un caldo de cultivo con triptosa-lauril sulfato (LST) a las 48 h a 35°C. (4)

Un presunto coliforme es confirmado cuando produce gas en un medio de lactosa con verde brillante al cabo de 48 h a 35 grados centígrados. (4)

El grupo de coliformes incluye Escherichia coli, Citrobacter freundii, Enterobacter aerógenes, E. cloacae y Klebsiella pneumoniae. Hay unas pocas cepas de otras especies más que fermentan la lactosa y que podrían ser incluidas en una determinación coliforme. (4)

Los coliformes se encuentran en el suelo no alterado y pueden alcanzar niveles elevados en los contaminados con materia fecal. En ciertas condiciones suelen morir en el suelo, pero con nutrientes apropiados y humedad incrementan su número. El polvo del suelo puede diseminar coliformes en la atmósfera y la lluvia transporta la contaminación superficial del suelo a los arroyos, ríos y lagos. (4)

Los coliformes se encuentran en todas partes de las plantas (hojas, raíces, flores). La mayoría de las hortalizas frescas examinadas presentan niveles de coliformes de  $10^6$  a  $10^7$ /g. (4)

Debido a ésto para el consumo de hortalizas crudas el hombre debe emplear métodos de desinfección. La desinfección no significa destrucción o eliminación de todas las células bacterianas activas sino que todas las bacterias patógenas y un tanto por ciento de las no patógenas presentes en la superficie de los vegetales sean destruidas. (4,27)

#### 5. Desinfectantes

Un desinfectante o sanitizante tiene como fin reducir la carga microbiana viable hasta niveles aceptables, desde el punto de vista Salud Pública. (27)

La eficacia de la desinfección depende de: la concentración del producto, a mayor concentración del producto, mayor acción; el tiempo de acción, a mayor tiempo de exposición, mayor acción; a mayor tiempo, menor es la concentración requerida para determinado efecto, y viceversa; el pH altera la acción desinfectante al incidir a la vez sobre las bacterias y el producto desinfectante. Una elevación de la temperatura normalmente acelera la acción del desinfectante; del tipo y cantidad de microorganismos existentes así como de su sensibilidad. (4,27)

Son miles los productos químicos provistos de poder germicida, pero sólo los productos homologados por una entidad reguladora pueden utilizarse como desinfectantes. Los desinfectantes más comúnmente empleados en hortalizas son el cloro y sus derivados. (4)

## 6. Cloro

Aunque el cloro es uno de los elementos más ampliamente distribuidos sobre la tierra, no se encuentra en su estado libre en la naturaleza. En cambio, existe en su mayor parte en combinación con sodio, potasio, calcio y magnesio. El cloro elemental es un gas pesado de coloración verde amarillenta con un olor penetrante e irritante. Fue en la primera mitad del siglo XIX que se descubrieron sus propiedades desinfectantes y deodorizantes. (30, 18, 13)

La concentración de un hipoclorito en solución es frecuentemente establecida como "cloro disponible", que es una medida de la capacidad oxidante y es expresada en términos de la cantidad equivalente de cloro elemental. En el caso de los hipocloritos, éste término indica la cantidad de cloro inicialmente usado para preparar el hipoclorito en cuestión, incluyendo el cloro consumido para formar el ión cloruro germinicidamente inactivo. (30,13)

### 6.1 Cuantificación de Cloro

Existen varios métodos para determinar el cloro disponible en solución o en productos. En el método yodimétrico el cloro libre libera yoduro en la solución de prueba acidificada, conteniendo yoduro de potasio (KI), y el yoduro liberado es titulado con una solución de tiosulfato de sodio estandarizada, agregando almidón como indicador cerca del final de la reacción. (30, 23, 8, 22, 2, 18).

## 6.2 Factores que afectan la eficiencia del Cloro

La efectividad germicida del cloro depende ampliamente de la concentración de ácido hipocloroso no disociado en solución acuosa y de la relación entre el pH y el grado de disociación del HOCl. En adición al pH varios factores ambientales más, sólo o en combinación, determinarán la actividad antimicrobiana del cloro. (30, 4)

6.2.1 El factor pH es tal vez la influencia más grande sobre la actividad antimicrobiana del cloro en solución. Un incremento en el pH decrece substancialmente la actividad biocida del cloro y un decremento del pH incrementa ésta actividad. (30,1)

6.2.2 Un incremento en la concentración de cloro disponible en la solución puede llevar a un correspondiente incremento en la actividad antibacteriana. Por incremento del cloro disponible en soluciones de hipoclorito de 0.3 a 0.6, 1.2 a 2.0 ppm, el tiempo de muerte es reducido o la proporción bactericida aumentada. Un incremento de 4 veces en la concentración de la solución de hipoclorito resultará en un 50% de reducción en el tiempo de muerte y un incremento de 2 veces sólo reduce el 30% el tiempo de muerte. (30)

6.2.3 Un incremento en la temperatura reduce el tiempo de muerte de las bacterias. Los efectos de temperatura sobre la acción bactericida de cloro libre disponible son especialmente evidentes en un pH mayor de 8.5, y también cuando los residuos de cloro son bajos (0.02 a 0.03 ppm). Un aumento de 10 grados centígrados produce una reducción de 50 a 60% en el tiempo de muerte y una caída de 10 grados centígrados incrementa el tiempo de exposición necesario por cerca de 2.1 a 2.3 veces. Los coeficientes de temperatura son afectados levemente por el pH. (30,20)

6.2.4 La materia orgánica en soluciones de cloro consume cloro disponible y reduce su capacidad para la actividad bactericida; esto es evidente especialmente en soluciones con bajos niveles de cloro. Se ha reportado que los hipocloritos son selectivos en su ataque sobre varios tipos de materia orgánica. (30)

De entre varios azúcares sólo la levulosa consume cloro y el cloro enlazado a otros sustratos no nitrogenados (lípidos y alcoholes) es insignificante. El hipoclorito de sodio es más reactivo con sustratos orgánicos que la Clotamina T o Azocloramida. (30)

Si la materia orgánica contiene proteínas, el cloro reacciona y forma cloraminas, reteniendo algo de su actividad antibacteriana, aunque los niveles de cloro son reducidos considerablemente. (30)

Parece que azúcares tales como almidones no afectan la actividad germicida del cloro. Otros materiales orgánicos tales como tirosina, triptofano, cisteína, albúmina de huevo, peptona, cuerpos fluidos, tejidos, microbios, materia vegetal, etc., cuando están presentes en una solución sanitizante, consumirán cloro para satisfacer la demanda orgánica; en este caso el cloro puede perder la función de agente germicida. Esta pérdida de cloro debida a la materia orgánica puede ser significativa en casos donde cantidades diminutas de cloro son empleadas. Elevados niveles de cloro, sin embargo, tienden a producir una reserva segura para llevar a cabo la acción bactericida deseada. (30)

6.2.5 Componentes de aguas duras tales como iones magnesio y calcio no exhiben ningún efecto sobre la acción antibacteriana de las soluciones de hipoclorito. El aumento de la dureza del agua de 0 a 400 ppm no exhibe ningún efecto inhibitorio sobre la muerte bacteriana en soluciones de hipoclorito. (30, 20)

La actividad bactericida de cloro libre es disminuída considerablemente cuando el cloro es adicionado a agua conteniendo amonio o compuestos de amonio y la concentración de cloro es llevada a cloro residual. Parte del cloro reacciona inmediatamente con el amonio para formar mono- y dicloraminas. (30)

Pequeñas adiciones de bromo o yodo a soluciones de cloro aumentan ampliamente la actividad bactericida del cloro. (30)

Varios tipos de bacterias, virus, hongos y algas exhiben diferente resistencia a hipocloritos bajo diversas condiciones prácticas. Esta resistencia selectiva de organismos al cloro puede ser compensada por un incremento en la concentración, por disminución de pH, o por aumento de la temperatura. Células vegetativas son menos resistentes al cloro que el grupo formador de esporas y niveles de 0.15 a 0.25 ppm de cloro disponible son suficientes para destruir al grupo de bacterias vegetativas en 30 segundos. (30, 8, 36)

Ya que E. coli es generalmente más resistente al cloro que otros organismos vegetativos, es seleccionada para determinar la efectividad de desinfección del cloro. Los organismos formadores de esporas son cerca de 10 a 1000 veces más resistentes al cloro que las formas vegetativas. (30, 34, 8, 36)

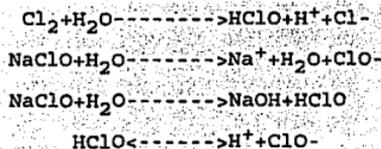
Para demostrar cuan efectivos pueden ser los compuestos clorados contra varios tipos de microorganismos bajo diferentes condiciones a nivel del laboratorio, muchos métodos de prueba se vieron en décadas pasadas. Inicialmente el cloro fue evaluado para su efectividad bactericida por el método de Coeficiente Fenólico. Aunque ésta técnica pudo ser un buen procedimiento para evaluar fenoles y compuestos fenólicos, no se encontró adecuada para probar los compuestos clorados adecuadamente, siempre resultando un valor menor que el verdadero para la efectividad del cloro. (30)

Existen muchos test de laboratorio para evaluar la efectividad de un producto desinfectante, pero sólo son válidos aquellos en que se inactiva el poder germicida pasado el tiempo de exposición en estudio, ya que de otra manera el remanente de éste seguiría actuando durante todo el período en que se incuban los gérmenes cuya sensibilidad se investiga. (27)

### 6.3 Mecanismos de Acción.

A pesar de conocerse bien las características de cloro como desinfectante, el mecanismo de acción no ha sido bien dilucidado; al respecto se tienen numerosas teorías que tratan de explicar tal mecanismo, sin embargo, parecen no estar totalmente de acuerdo con una prueba experimental completa. (30)

-Anrewes y col. entre otros investigadores sugieren que el ácido hipocloroso sea el responsable de la destrucción de microorganismos. Cuando el cloro elemental o hipoclorito son adicionados al agua llevan a cabo las siguientes reacciones:



La disociación del ácido hipocloroso depende del pH y del equilibrio entre  $\text{HClO}$  y  $\text{ClO}^-$  mantenido, aunque  $\text{HClO}$  es constantemente consumido por su función germicida. Ya que la eficacia desinfectante del cloro decrece con un incremento de pH y viceversa, lo cual es paralelo a la concentración de ácido hipocloroso no disociado, esto indica que  $\text{HClO}$  puede estar más lejos de un poder bactericida que  $\text{ClO}^-$ . Se conoce que soluciones alcalinas de hipocloritos tanto de sodio como de calcio con muy poca cantidad de  $\text{HClO}$  y grandes cantidades de  $\text{ClO}^-$  definitivamente poseen propiedades bactericidas. Esto sugiere que los iones  $\text{ClO}^-$  pueden contribuir a la desinfección, sin embargo, se ha encontrado que el ión  $\text{ClO}^-$  no posee un poder cisticida. Una explicación puede ser que trazas de  $\text{HClO}$  son consumidas en el proceso germicida, el equilibrio de hidrolisis será hacia la izquierda y el  $\text{HClO}$  se formará continuamente para efectuar la acción bactericida. Ya que el ión  $\text{ClO}^-$  contiene cloro activo, puede ser que tenga un poder germicida. (30)

Baker (1926) expone la teoría de que el cloro destruye a la bacteria por combinación con proteínas de la membrana celular formando compuestos N-clorados los cuáles interfieren con el metabolismo de la célula, causando la muerte del microorganismo. (30)

Otras teorías postulan que la acción del cloro cambia la membrana celular para permitir la difusión del contenido celular al exterior o que existe la destrucción mecánica de las membranas celulares debido a la desinfección por cloro. (30)

Rudolph y col. (1941) proponen que el efecto bactericida del hipoclorito se lleva a cabo en dos fases sucesivas: 1) la penetración de un ingrediente germicidamente activo dentro de la célula bacteriana, y 2) la reacción química de éste ingrediente con el protoplasma de la célula para formar complejos tóxicos (compuestos N-clorados) los cuáles destruyen al microorganismo. (30,4)

Green y col. postulan que debido al bajo nivel de cloro requerido para la acción bactericida, el cloro puede inhibir algunas llaves de reacción enzimática dentro de la célula. Se encuentra correlación entre el efecto del cloro sobre el crecimiento bacteriano y el efecto sobre la oxidación de glucosa por la célula bacteriana. (30, 4)

Knox y col. (1948) confirman que el efecto bactericida del cloro es producido por la inhibición de ciertos sistemas indispensables de enzimas para vivir y que su mecanismo es el resultado de la acción oxidativa del cloro sobre los grupos SH de enzimas vitales y otras enzimas sensibles a la oxidación por cloro. Esta reacción es aparentemente irreversible, ya que intentos por causar reversión de la reacción por adición de cisteína o glutatión no fueron útiles. La inhibición de reacciones metabólicas citoplasmáticas esenciales es en mucho el responsable de la destrucción de la célula bacteriana. (30, 4)

Friberg (1956), usando Cloro radiactivo,  $Cl^{35}$ , estudiando cuantitativamente si se unía o no con la bacteria y cuánto de éste se combinaba. Se encontró que el cloro libre disponible se puede localizar después de un período de cloración de 5 minutos y que la combinación de cloro con la bacteria se incrementa con un mayor tiempo de exposición y con un aumento en la concentración. La combinación química del cloro con el protoplasma de la bacteria da lugar a cloraminas que no parecen contribuir al efecto bactericida inicial y las primeras reacciones de oxidación del cloro con las células bacterianas, antes de la acumulación, son responsables de la acción bactericida. El cloro en bajas concentraciones puede destruir rápidamente las bacterias, previo a la formación de compuestos N-clorados dentro del protoplasma. (30)

Friberg (1957) usando fósforo radiactivo ( $P^{32}$ ) demostró que el cloro en muy pocos minutos, da lugar a un cambio destructivo en la permeabilidad de la membrana de la pared bacteriana. Esto es evidente por el escape de  $P^{32}$  de nucleoproteínas de la célula bacteriana. (30)

Charlton y col. creyeron que las cloraminas tienen su acción germicida debida a una acción de cloración directa por los átomos de cloro activo de moléculas de cloramina no disociadas. Más tarde Chang (1944) indicó que algunas cloraminas (halozona, dicloramina) son hidrolizadas a  $HOCl$  y entonces exhiben un poder penetrante cístico, mientras que monocloraminas y succinloramida no producen una cantidad detectable de  $HOCl$  en hidrólisis en un lapso de 2 horas, por lo que son malos penetradores císticos. (30)

Marks y col (1945) junto con Chang (1944) indicaron que dos mecanismos diferentes de acción germicida ocurren con los compuestos N-clorados: 1) La molécula de cloramina no disociada actúa directamente sobre la bacteria, y 2) el HOCl formado vía hidrólisis de los compuestos N-clorados es el agente que da muerte. Como el pH llega a ser un factor importante en la actividad germicida del ácido hipocloroso, también exhibe una importante influencia sobre la formación de cloraminas y sobre la acción bactericida de la cloramina. (30)

Barrette y col (1989) concluyen que la muerte celular se acompaña por una completa ruptura de la producción bacteriana de ATP por vía oxidativa y fermentativa como consecuencia de la inhibición del sistema de enlace de la membrana interna responsable de éste proceso, debido a la acción del HOCl. (5)

#### 6.4 Ventajas y Desventajas del Cloro

De los compuestos clorados los hipocloritos (de sodio y calcio) son los más usados y conocidos en el campo de la desinfección química. Sus características principales son:

- 1) Potentes germicidas que controlan una amplia gama de microorganismos,
- 2) Deodorizantes,
- 3) No tóxicos para el hombre a las concentraciones usadas,
- 4) Libre de residuos tóxicos,
- 5) Incoloro,
- 6) No manchan,
- 7) Fácilmente manejables,
- 8) Relativamente baratos,
- 9) Acción rápida,
- 10) Inalterados por sales de aguas duras,
- 11) Eficaces en fuerte dilución,
- 12) Concentración fácilmente detectable,
- 13) Pueden usarse en el tratamiento del agua. (30, 4)

Las desventajas que se tienen de los hipocloritos son:

- 1) Inestables durante el almacenamiento,
- 2) Inactivados por los compuestos orgánicos,
- 3) Corrosivos si son mal utilizados,
- 4) Irritan la piel,
- 5) Olor a veces inaceptable,
- 6) Precipitan las aguas ferruginosas,
- 7) La eficacia disminuye cuando aumentan el pH de la solución,
- 8) Pueden extraer el carbono de las piezas de caucho de la maquinaria. (4)

Debido a su amplia aceptación como desinfectantes en muchas industrias, las soluciones de hipocloritos sirven como standars para probar otros sanitizantes. Los hipocloritos son utilizados como desinfectantes en muchos hogares, hospitales, escuelas y edificios públicos. También son usados para control microbiológico en restaurantes, fuente de sodas, espacios públicos de comida, sanitizantes de plantas procesadoras de alimentos, lecherías cervecerías, vinaterías y plantas embotelladoras de bebidas. Los hipocloritos son comprados para tratamiento de piscinas, agua para beber, tratamiento de aguas de albañal y de deshecho. (30)

#### 6.5 Toxicidad del Cloro

La toxicidad del hipoclorito surge de su actividad corrosiva sobre la piel y membranas mucosas. Mucho de su corrosividad proviene de la potencia oxidante de sí mismo. Las soluciones ácidas hacen más peligroso al hipoclorito debido a la presencia de cloro libre y de ácido hipocloroso. (4, 13)

Debido a su baja ionización y consecuente falta de carga, éste ácido (HClO) es probablemente hábil para penetrar membranas mucosas más profundamente que los iones hipoclorito (ClO<sup>-</sup>). De aquí que los antidotos acídicos son inadmisibles y peligrosos.

(4, 13)

## 7. Dióxido de Cloro

El dióxido de cloro es ocasionalmente empleado para la purificación de agua debido a su poder bactericida y esterilizante; el dióxido de cloro,  $\text{ClO}_2$ , es un gas inestable, de color amarillo rojizo y olor desagradable. En comparación con el cloro, el dióxido tiene tono verde más profundo y olor más desagradable; por el olor se puede distinguir del cloro y del monóxido de cloro, y se le descubre en la presencia de estos gases siempre que la concentración de éstos no sea excesiva. (18)

El dióxido de cloro es irritante a la vías respiratorias, en lo cual se asemeja al cloro. Su olor es perceptible entre 14 y 17 ppm. Su acción es mortal al ser aspirado por 45 minutos en una atmósfera de 150 ppm. Es tan peligroso como el dióxido de nitrógeno. (18)

Este gas tiene singular importancia en la resolución de los problemas de sabor y de olor que dan los desechos fenólicos y otros residuos industriales, o que proceden de cloacas, de algas y de vegetales en descomposición; su eficacia bactericida se compara a la del cloro aunque su eficacia es afectada a niveles de pH de 6 a 10 y decrece con la baja de temperatura; tiene un gran poder esporicida, que se explica por su gran poder oxidante; se puede aplicar de manera que deje un residuo, el cual, siendo más persistente que el cloro, mantiene un efecto bactericida activo en el sistema. (30, 18)



## 8. Plata

Otro de los elementos que se ha utilizado como desinfectante es la plata, que se encuentra entre los primeros metales conocidos por el hombre con propiedades antibacterianas. Los preparados de plata coloidales no son corrosivos, ni astringentes, ni manchan la piel como las sales solubles de plata; son antisépticos en grado notable. La acción antiséptica de los coloides no es proporcional al contenido total de plata, pero es función de la concentración de los iones plata que liberan. (18)

En ninguno de los preparados coloidales es la concentración de plata iónica suficientemente alta para causar la precipitación de cloruros o de las proteínas; así, los preparados coloidales penetran los tejidos mucho más fácilmente que las sales simples de plata. (18)

La aplicación terapéutica principal de los preparados de plata coloidales es la antiseptia de las mucosas. Cuya eficacia se atribuye a la acción oligodinámica de la plata, que es la que ejercen las sustancias en cantidades infinitesimales. Cuando una suspensión bacteriana acuosa se pone en contacto con la plata, se nota una señalada acción antiséptica de la plata, aunque sólo haya entrado en solución una cantidad pequeñísima de ésta. (18, 28)

Los preparados coloidales de plata metálica se obtienen por reducción química o por electrorreducción de las sales de plata y se estabilizan por la adición de un derivado proteínico. (30, 18, 28)

Mezclando óxido de plata o nitrato de plata con gelatina o albúmina se obtiene un producto soluble en agua, el cual libera pocos iones de plata pero carentes de astringencia cáustica. (28)

Los iones plata, similares a muchos metales pesados, pueden formar complejos con grupos conteniendo, sulfuro, oxígeno o nitrógeno. En los sistemas biológicos estos están presentes como tioles, carboxilatos, fosfatos, hidroxilos, aminas, imidazoles, indoles, singularmente o en gran variedad de combinaciones. Un polipéptido puede contener todo en una simple molécula. (30)

Para una acción microbiana, la plata puede ser usado como: metal en una forma activa; en soluciones coloidales; adsorbido sobre carbón, gasa u otra forma física, en los cuales, el agente activo parecen ser los iones plata producidos allí. (30)

#### 8.1 Mecanismos de Acción

Muchas enzimas, bajo condiciones in vitro, son inhibidas por la plata, y en varios estudios es más eficiente que los compuestos organomercuriales. (30)

La gran eficiencia observada por la plata comparada con la del mercurio algunas veces es atribuida a la gran habilidad para unirse a los grupos sulfhidrilo de las proteínas de las bacterias. (30)

Rogers (1972) postula que los iones plata inhiben la lactato deshidrogenasa por causa de un cambio conformacional, mientras que el p-cloromercuribenzoato bloquea de fuera afectando la estructura. Cuando las proteínas son desnaturalizadas primero, las actividades cinéticas de los tioles en una enzima parecen equivalentes en reactividad a los iones plata y al arilmercurio. (30)

El ataque microbiano puede tomar varias rutas. Wysor y Zollinhofer (1973) sugieren que la sulfadiazina de plata es bactericida en contradicción al nitrato de plata que es bacteriostático, debido a que más plata alcanza el DNA bacteriano y bloquea la replicación. Pseudomona aeruginosa fue expuesta a una concentración subletal, 4 mcg/ml del complejo de plata y sulfa en estos estudios. (30)

Los mismos investigadores (Wysor y Zollinhofer (1972)) encontraron que los uracilos de plata no penetran bacterias o células eucarióticas. El complejo de plata, en la membrana de la célula bacteriana, puede interferir con el proceso de cadenas transportadoras de electrones o liberar plata como resultado de la degradación enzimática. No se pudo establecer la reacción del complejo intacto con los ácidos nucleicos. (30)

Modak y Fox usaron  $Ag^{110}$  y  $S^{35}$  marcados a sulfadiazina de plata con el mismo organismo. Practicamente la sulfadiazina por sí misma no se encontró en las células, y mucho del metal estaba enlazado con el DNA; la afinidad con el RNA es sólo de 1/40 y el enlace a residuos celulares (pared y membrana) es de 1/10

en comparación al DNA. Aparentemente, la inhibición se lleva a cabo cuando suficientes pares de bases en la hélice del DNA son enlazados por plata. El enlace es reversible y el mecanismo parece ser el mismo para ambos compuestos pero la diferencia está en el grado de afinidad. (30)

Coward y col. (1973) usaron microscopio electrónico y se encontró que sulfadiazina de plata, la cual es prácticamente no ionizada, ataca la pared y membrana celular produciendo burbújas. Cepas resistentes a la sal no muestran estos cambios. El nitrato de plata actúa en forma diferente; no causa burbújas pero produce agregación de material nucleico dentro de los filamentos. (30)

Formación de complejos entre  $Ag^+$ , nucleósidos y nucleótidos fueron estudiados por Phillips y George (1968) y desarrollaron datos termodinámicos de una titulación potenciométrica de adenosina usando concentración de plata en células para medir  $Ag^+$  a diferentes temperaturas. El ión metálico enlaza dos moles del nucleósido para formar  $Ag^+(adenosina)_2$ . (30)

$Ag^+ + \text{Ligando} \rightleftharpoons AgL$   $\text{Log } K_1 = 2.02$   $H = -5.49 \text{ kcal/mol}$

$AgL + \text{Ligando} \rightleftharpoons AgL_2$   $\text{Log } K_2 = 1.84$   $H = -3.66 \text{ kcal/mol}$

Las energías involucradas, relativamente bajas se correlacionan con la reversibilidad de inhibición.

## 8.2 Toxicidad

Los rangos de toxicidad oral aguda van de 2 a 30mg de Ag+; la toxicidad oral sub aguda es aparentemente rara. La absorción también puede ser por tracto respiratorio, pero es primero por vía oral. Los síntomas de toxicidad por ingestión incluyen:

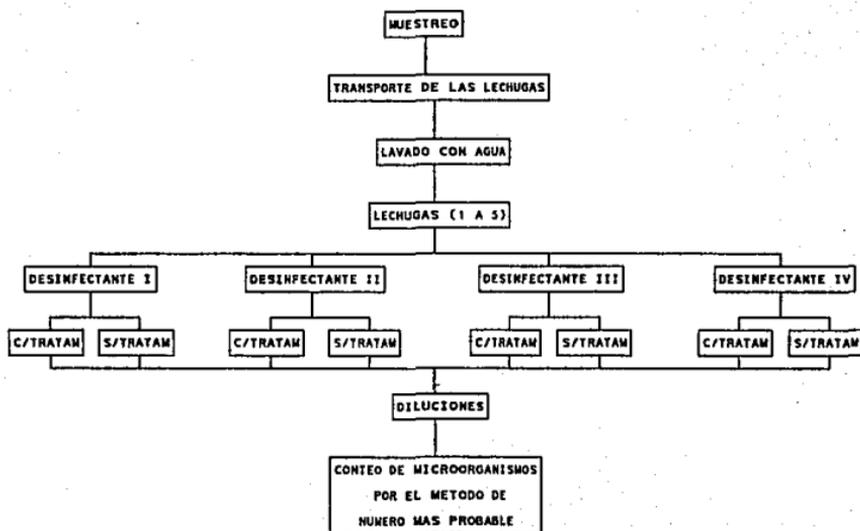
gastroenteritis y reacciones graves tales como: coma, convulsiones, parálisis y disturbios severos en la respiración. El tratamiento es con sal común, jabón, y estimulantes para mantener la circulación. (30, 13)

## O B J E T I V O S

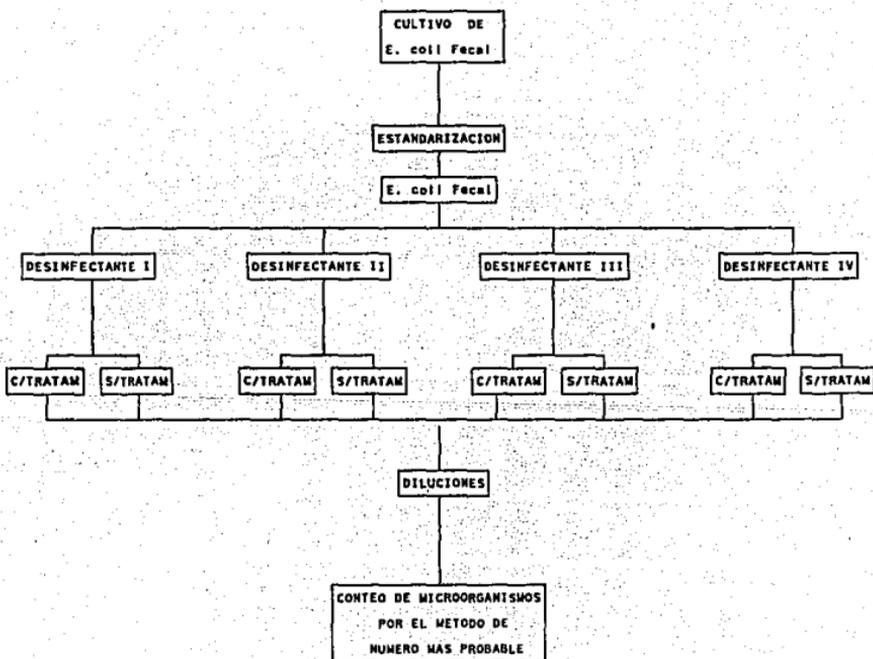
- Comparar la acción bactericida de los desinfectantes a base de compuestos clorados (Hipoclorito y clorito de sodio) (clorato, cloruro y clorito de sodio) (Dióxido de cloro) con uno a base de plata (plata coloidal).
- Determinar el desinfectante clorado de mayor eficacia.
- Determinar la concentración de principio activo de cada desinfectante.

## PLAN DE TRABAJO

### ANALISIS BACTERIOLOGICO

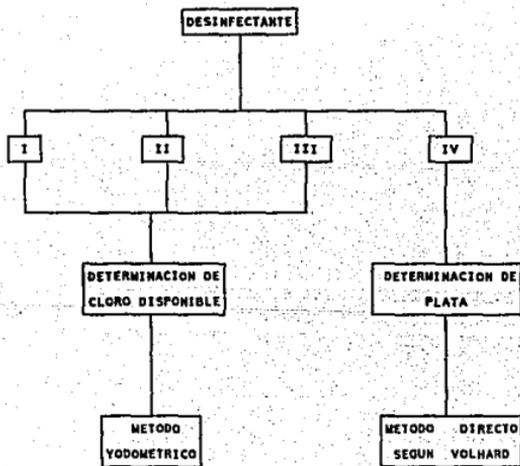


**ANALISIS BACTERIOLOGICO SOBRE E. coli**  
**Fecal EN MEDIO ACUOSO A CONCENTRACION**  
**CONOCIDA PARA UNA**  
**EVALUACION DE LA INTERFERENCIA VEGETAL**



DETERMINACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS

EN LOS PRODUCTOS COMERCIALES



## MATERIAL Y METODOS

### MATERIALES.

#### 1. Muestras Biológicas

- a) 5 lechugas (variedad romana)

Las muestras fueron adquiridas en el Tianguis de la localidad de C. Izcalli, correspondiente a los días lunes.

- b) Escherichia coli de origen fecal.

La cepa de E. coli fue proporcionada por el cepario del Laboratorio de Bacteriología de la Sección de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

#### 2. Desinfectantes

Los productos estudiados correspondieron a aquellos de uso doméstico más frecuente, disponibles en el mercado.

- a) Un producto a base de compuestos clorados (hipoclorito de sodio 10%, clorito de sodio 5%).
- b) Un producto a base de compuestos clorados (Clorito de sodio 15%, Cloruro de sodio 10%, clorato de sodio 8%)
- c) Un producto a base de un compuesto clorado (Dióxido de cloro estabilizado)
- d) Un compuesto a base de plata coloidal al 0.32%.

### METODOS

#### 1. Toma de muestras

Se realizó un muestreo al azar de cinco lechugas (variedad romana); expandidas en el mismo lugar. (14)

Las muestras se transportaron inmediatamente al laboratorio; en forma aséptica, a temperatura ambiente; contenidas en bolsas de plástico, cerradas; procediendo a su análisis bacteriológico el mismo día. (29)

## 2. Análisis Bacteriológico

Las muestras fueron analizadas por el método de Número más Probable (NMP) (4, 19, 26, 29, 32); con algunas variantes, que a continuación se explican.

### 2.1 Prueba presuntiva

#### 2.1.1 Tratamiento de desinfección.

- De la lechuga a trabajar, se tomaron la cuatro hojas más externas que no estuvieran maltratadas.
- Se lavaron con agua de la llave, procurando quitar toda la suciedad y material extraño posible simulando un tratamiento doméstico.
- Se mantuvieron envueltas en papel aluminio flameado, sobre hielo, evitando el contacto con agua procedente del hielo y el polvo del ambiente, en lo que se procedía a su análisis.
- Se tomó una hoja y se partió por la mitad en forma transversal auxiliándose de tijeras y pinzas estériles.

- Una de las mitades se colocó en un litro de agua destilada cubriéndose con papel aluminio flameado, tomando ésta como control positivo, y la otra mitad se colocó en un litro de agua destilada más 15 gotas del desinfectante a base de Hipoclorito de sodio y clorito de sodio (Desinfectante I) que es la dosis recomendada por el fabricante, cubriéndose también con papel aluminio flameado. Ambas mitades se mantuvieron así por 40 minutos, que es el tiempo recomendado por el fabricante. (19, 29)

-Pasados los 40 minutos se neutralizó la acción del desinfectante con una solución de Tiosulfato de sodio al 10% en dosis de 0.1 por 100 ml de agua, el cual se preparó disolviendo 10 g de tiosulfato de sodio pentahidratado en 100ml de agua destilada, se filtró a través de papel filtro micropor y se guardó en un frasco estéril color ambar. (21,27)

- Ambas partes se sacaron del agua y la que sólo tuvo contacto con agua destilada se colocó en papel aluminio flameado sobre hielo mientras se procedía al tratamiento bacteriológico de la parte que estuvo en contacto con el desinfectante.

#### 2.1.2 Diluciones

-Se tomaron 10 g de esta mitad, teniendo cuidado que fueran de diferentes partes de la hoja manteniendo condiciones de esterilidad durante todo el proceso.

-Se vaciaron los 10g de muestra en un frasco de vidrio estéril conteniendo 90ml de agua peptonada al 0.1% estéril y se licuó con un virtiz de 1 a 2 minutos hasta obtener una suspensión completa y homogénea. Obteniendo así la primera dilución de la muestra.

- De ésta primera dilución se pipetearon 10 ml de homogenizado de lechuga a un frasco de dilución de leche conteniendo 90 ml de agua peptonada estéril al 0.1%, agitando enérgicamente 25 veces en un arco de 30 cm, repitiendo la operación para las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , y  $10^{-5}$ ; dejando reposar la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente para permitir la reactivación de los microorganismos. (33)

- De cada dilución se pipeteó un mililitro de homogenizado de lechuga en tubos con 9 ml de caldo lauril sulfato de sodio estéril conteniendo tubos de Durham, utilizando tres tubos por dilución.

- Los tubos se incubaron a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  en Baño María por 24hrs.

-Pasadas las 24 hrs se anotaron los tubos que presentaron producción de gas y se prosiguió la incubación de los tubos por 24 hrs más.

-Pasadas las 48 hrs de incubación los tubos con presencia de gas se remitieron a la prueba confirmativa.

## 2.2 Prueba Confirmativa

- Se agitaron suavemente los tubos positivos, resemebrando de 2 a 3 asadas del contenido de cada tubo a un tubo conteniendo 9 ml de caldo lactosa bilis 2% verde brillante estéril y tubo de Durham.

- Al efectuar la resiembra se inclinó el tubo primario (prueba presuntiva) en un ángulo tal que se pudiera tomar la asada, evitando la película que existía en el medio. Se sacó el asa en sentido perpendicular a su superficie de manera que se formara un menisco bien definido.

-Se incubaron los tubos por 24 y 48 hrs a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , considerando la prueba positiva con la formación de cualquier cantidad de gas; confirmando así la presencia de coliformes en la lechuga.

-Conociendo el número de tubos positivos y negativos de cada dilución, se determinó el número más probable de microorganismos presente en la muestra, tomando en cuenta que el empleo de las tres primeras diluciones a partir de la dilución 1:10 (3 tubos con 1ml de la primera dilución, 3 tubos con 1ml de la segunda dilución y 3 tubos con 1ml de la tercera dilución) permite obtener directamente a través de los valores de la tabla correspondiente, el número de microorganismos por gramo de muestra. Y ya que la serie seleccionada incluye diluciones de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , multiplicar la cifra correspondiente a la combinación de tubos positivos en la tabla por 100.

El mismo tratamiento se llevó a cabo para el control positivo.

Con los demás desinfectantes se siguió el mismo procedimiento respecto a las hojas, con algunas variantes recomendadas por el fabricante, tales como: a) el desinfectante II usado para la siguiente media hoja fue uno a base de Clorito de sodio, Cloruro de sodio y clorato de sodio, y se puso en contacto con ella por 20 minutos en dosis de 3 gotas por litro, estando el control positivo en contacto con el agua también por 20 minutos y utilizando como neutralizante tiosulfato de sodio al 10% en dosis de 0.1ml por 100 ml de agua.

b) el desinfectante III que se puso en contacto por 15 minutos con la siguiente media hoja en dosis de 3 gotas por litro fue un compuesto a base de Dióxido de cloro estabilizado que se neutralizó pasado el tiempo de exposición con tiosulfato de sodio al 10% en dosis de 0.1ml por 100ml de agua y estando el control positivo en agua destilada por 15 minutos.

c) el desinfectante IV que se puso en contacto con la siguiente media hoja por 15 minutos en dosis de 5 gotas por litro fue un compuesto a base de Plata coloidal al 0.32%, siendo neutralizado con cloruro de sodio al 10% en dosis de 0.1ml por 100ml de agua, al final del tiempo de exposición y, manteniendo al control positivo en contacto con agua destilada por 15 minutos.

Evaluando así los 4 desinfectantes en una lechuga.

Trabajando de la misma forma las 4 lechugas posteriores.

### 3.-Evaluación de la interferencia vegetal

-Se cultivó E. coli fecal en caldo soya tripticaseína incubándola en baño María a 35°C hasta alcanzar una lectura de 0.2 y 0.3 de absorbancia a una longitud de onda de 550nm.

- De estos cultivos se pipetearon 2ml en 2lt de agua destilada estéril (15lb de presión por 15 minutos), y se le agregaron 10 gotas del desinfectante I dejándolo en contacto en el agua por 20 minutos, que son tiempo y dosis recomendado por el fabricante para desinfección del agua.

-Transcurrido el tiempo de contacto entre desinfectante y bacterias se neutralizó el desinfectante utilizando una solución de tiosulfato de sodio al 10% en dosis de 0.1ml por 100ml de agua.

-Siguiendo el mismo tratamiento empleado con las muestras de lechuga, hasta obtener el número más probable de microorganismos presentes en el agua tratada con y sin desinfectante.

De la misma forma se trabajo con los 3 desinfectantes restantes siendo su dosis y tiempo de exposición:

Para el desinfectante II 10 gotas por 20 minutos; neutralizándose con tiosulfato de sodio al 10% en dosis de 0.1ml por 100ml de agua.

Para el desinfectante III 6 gotas por 15 minutos; neutralizándose con tiosulfato de sodio al 10% en dosis de 0.1ml por 100ml de agua.

Para el desinfectante IV 1 gota por 20 minutos; neutralizándose con cloruro de sodio al 10% en dosis de 0.1ml por 100ml de agua.

- También se trabajó un control positivo, el cual contenía 2ml del cultivo microbiano en dos litro de agua destilada estéril, perfectamente mezclado, del cual se procedió a sacar el número más probable de microorganismos.

Evaluando así la interferencia del vegetal.

#### 4.- Determinación de principios activos presentes en cada desinfectante

- A los desinfectantes I, II y III, que contienen compuestos clorados, se les determinó la cantidad de cloro disponible, por el método Yodométrico, variando sólo la cantidad de alícuota de cada desinfectante debido a la diferencia de concentraciones de cloro disponible. (2, 3, 18, 23, 30, 34)

- Del desinfectante I, (compuesto clorado a base de hipoclorito de sodio y clorito de sodio) se transfirió 1ml de desinfectante a un matraz erlenmeyer.

- Se le adicionaron 50ml de agua destilada, 2g de yoduro de potasio (KI), 10ml de ácido acético 6N.

- Se tapó el matraz, dejándose reposar por 10 minutos.

- Pasados los 10 minutos, se retiró la tapa, se enjuagaron las paredes del matraz con 3 ml de agua destilada.

- El yodo ( $I_2$ ) liberado se tituló con una solución de tiosulfato de sodio  $Na_2S_2O_3$  0.01245N.

- Se agregaron 3ml de engrudo de almidón cuando casi la totalidad del yodo se había decolorado y la solución tenía un color amarillo claro.

- Se siguió la titulación hasta que el yodo fue totalmente consumido, percibiéndose por la desaparición del color azul y se anotó el volumen de tiosulfato empleado para reducir el yodo liberado por el cloro.

- Se hicieron varias titulaciones hasta que dos valores obtenidos no difirieran entre sí más de 0.1ml.

- Se llevó a cabo una determinación blanco para saber si era necesario hacer correcciones a los volúmenes gastados.

-Del Desinfectante II (Compuesto a base de clorato, clorito y cloruro de sodio) se tomó una alícuota de 1ml titulándola de igual manera que el Desinfectante I.

-Del Desinfectante III (Compuesto a base de Dióxido de cloro estabilizado) se tomaron inicialmente 5ml, los cuales se aforaron a 50ml, de éstos se tomó 1ml como alícuota y se procedió a titular de la misma manera que los dos desinfectantes anteriores; teniendo una alícuota real del desinfectante de 0.1ml.

-Del Desinfectante IV (Compuesto a base de plata coloidal) se tomaron 53ml, los cuales se aforaron a 100ml con ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) concentrado y se dejaron en reposo por 24hrs a temperatura ambiente. (22)

-Se tomó una alícuota de 25ml y se le agregaron 5ml de solución de alumbre de hierro y amonio como indicador.

-Se tituló con una solución de sulfocianuro de potasio (KSCN) hasta que hubiese un color rojizo permanente.

#### 5. Análisis Estadístico

Se realizó un Análisis de Covarianza para evaluar la diferencia entre los desinfectantes, en un diseño de bloques completamente aleatorios; la covariable fue el número de bacterias inicial y la variable de respuesta fue el número de bacterias resultante después de la aplicación del desinfectante. (32)

Para la comparación de pares de medias se utilizó el Método de Tukey y se utilizaron Contrastes Lineales para hacer las siguientes comparaciones, entre los desinfectantes:

I, II y III vs IV

I vs II y III

I y II vs III

I y III vs II

del Análisis Bacteriológico realizado en Lechuga, y

I, II y III vs IV

del Análisis Bacteriológico realizado en Medio Acuoso a E. coli Fecal.

## RESULTADOS

### 1.- Análisis Bacteriológico realizado en Lechuga

Los datos obtenidos del Análisis Bacteriológico, realizado a cinco Lechugas, variedad romana, frente a cuatro desinfectantes de uso doméstico, recomendados para la desinfección de frutas y verduras; expresados como Número de Coliformes/g de muestra son: para la Lechuga No. 1; 110000, 110000, 110000 y 110000 como valores iniciales; 1400, 4200, 46000 y 2700 como valores finales frente a los Desinfectantes I, II, III y IV respectivamente. Para la lechuga No. 2; 93, 93, 93 y 93 como valores iniciales; 0, 20, 39 y 15 como valores finales frente a los Desinfectantes I, II, III y IV respectivamente. Para la Lechuga No. 3; 43, 3.6, 93 y 1100 como valores iniciales; 21, 0, 43 y 23 como valores finales frente a los Desinfectantes I, II, III y IV respectivamente. Para la Lechuga No. 4; 3.6, 34, 75 y 1100 como valores iniciales; 0, 23, 23 y 3.6 como valores finales frente a los desinfectantes I, II, III y IV respectivamente. Para la Lechuga No. 5; 9.1, 43, 75 y 9.1 como valores iniciales; 3.6, 3.6, 23 y 3.6 como valores finales frente a los Desinfectantes I, II, III y IV respectivamente. (Cuadro 1A)

CUADRO 1A

EFFECTO DE LOS DESINFECTANTES SOBRE LA CARGA DE COLIFORMES TOTALES  
EN LAS LECHUGAS

LECHUGA	No. COLIFORMES/g	DESINFECTANTE I	DESINFECTANTE II	DESINFECTANTE III	DESINFECTANTE IV
1	INICIALES	110,000	110,000	110,000	110,000
	FINALES	1,400	4,200	46,000	2,700
2	INICIALES	93	93	93	93
	FINALES	0	20	39	15
3	INICIALES	43	3.6	93	1,100
	FINALES	21	0	43	23
4	INICIALES	3.6	34	75	1,100
	FINALES	0	23	23	3.6
5	INICIALES	9.1	43	75	9.1
	FINALES	3.6	3.6	23	3.6

A continuación se indica la transformación logarítmica de los resultados antes descritos, misma que fue utilizada en el análisis estadístico: para la Lechuga No. 1; 5.04, 5.04, 5.04 y 5.04 como valores iniciales; 3.14, 3.62, 4.66 y 3.43 como valores finales frente a los Desinfectantes I, II, III y IV respectivamente. Para la Lechuga No. 2; 1.96, 1.96, 1.96 y 1.96 como valores iniciales; 0, 1.3, 1.59 y 1.17 como valores finales frente a los Desinfectantes I, II, III y IV respectivamente. Para la Lechuga No. 3; 1.63, 0.55, 1.96 y 3.04 como valores iniciales; 1.32, 0, 1.63 y 1.36 como valores finales frente a los Desinfectantes I, II, III y IV respectivamente. Para la Lechuga No. 4; 0.55, 1.53, 1.87 y 3.04 como valores iniciales; 0, 1.36, 1.36 y 0.55 como valores finales frente a los Desinfectantes I, II, III y IV respectivamente. Para la Lechuga No. 5; 0.95, 1.63, 1.87 y 0.95 como valores iniciales; 0.55, 0.55, 1.36 y 0.55 como valores finales para los Desinfectantes I, II, III y IV respectivamente.

(Cuadro 1B)

Los promedios del logaritmo base 10 del número de bacterias de las muestras antes y después de aplicar el desinfectante fueron: 2.026 y 1.002; 2.142 y 1.366; 2.54 y 2.12; 2.086 y 1.412 para los Desinfectantes I, II, III y IV respectivamente. (Gráfica 1A)

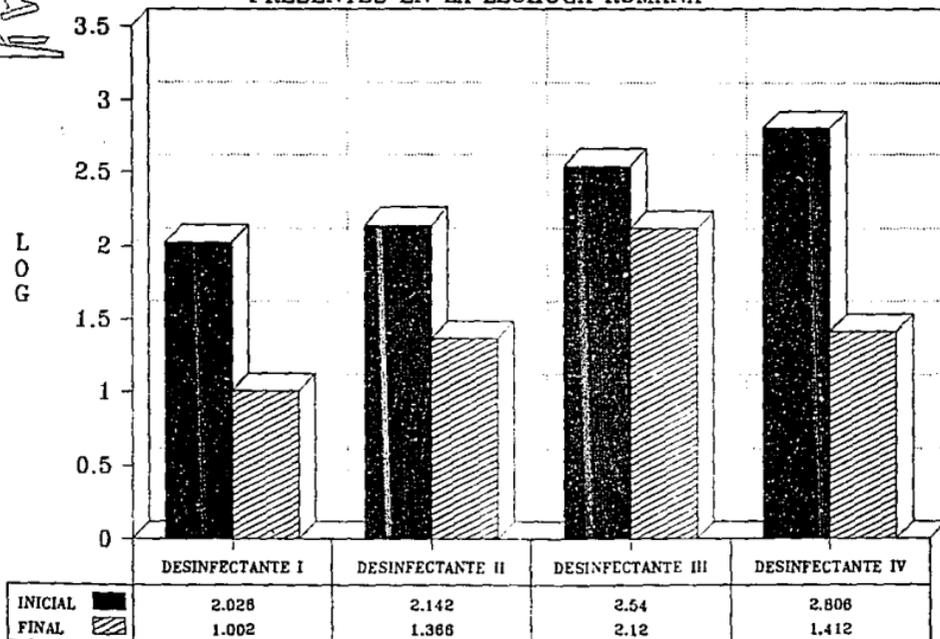
CUADRO 18

EFFECTO DE LOS DESINFECTANTES SOBRE LA CARGA DE COLIFORMES TOTALES EN LAS LECHUGAS  
EXPRESADO EN LOGARITMO BASE 10

LECHUGA	LOG No. COLIFORMES/g	DESINFECTANTE I	DESINFECTANTE II	DESINFECTANTE III	DESINFECTANTE IV
1	INICIALES	5.04	5.04	5.04	5.04
	FINALES	3.14	3.62	4.66	3.43
2	INICIALES	1.96	1.96	1.96	1.96
	FINALES	0	1.30	1.59	1.17
3	INICIALES	1.63	0.55	1.96	3.04
	FINALES	1.32	0	1.63	1.36
4	INICIALES	0.55	1.53	1.87	3.04
	FINALES	0	1.36	1.36	0.55
5	INICIALES	0.95	1.63	1.87	0.95
	FINALES	0.55	0.55	1.36	0.55

# GRAFICA 1A

ACCION DE LOS DESINFECTANTES  
SOBRE LA CARGA DE COLIFORMES TOTALES  
PRESENTES EN LA LECHUGA ROMANA



El Análisis de Covarianza de los resultados arreglados en un diseño por bloques aleatorios, en el que los bloques (o repeticiones) fueron las cinco lechugas trabajadas, indicó una diferencia significativa entre los desinfectantes ( $p=0.045$ ); además el Análisis de Covarianza corroboró las diferencias significativas entre los valores iniciales ( $p=0.00001$ ) (Cuadro 1C).

Los resultados del Análisis de Rango Múltiple por el Método de Tukey con un Nivel de Significancia del 5%, indica la diferencia entre los desinfectantes I y III únicamente; con una diferencia promedio de 1.118. (Cuadro 1C)

Los resultados del Contraste Lineal, para comparar los efectos promedios, entre los desinfectantes a base de compuestos clorados (I, II y III) y el desinfectante a base de plata coloidal indicó que no hay diferencia significativa.

Los resultados del Contraste Lineal, para comparar los efectos promedios, entre los desinfectantes a base de compuestos clorados, indicó una diferencia significativa entre: el promedio del desinfectante I (Hipoclorito de sodio y clorito de Sodio) y de los desinfectantes II (clorito de sodio y clorato de sodio) y III (Dióxido de Cloro) de  $p<0.05$ ; el promedio de los desinfectantes I (Hipoclorito de sodio y clorito de sodio) y II (clorito de sodio y clorato de sodio) contra III (Dióxido de cloro) de  $p<0.05$ . (Cuadro 1D)

**CUADRO 1C**

**ANALISIS DE COVARIANZA DEL EFECTO DE LOS DESINFECTANTES SOBRE LA CARGA DE COLIFORMES TOTALES EN LA LECHUGA CON LOS DATOS EXPRESADOS EN LOGARITMO BASE 10**

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	CUADRADOS MEDIOS	F-proporción	NIVEL DE SIG
COVARIABLES	25.045458	1	25.045458	108.477	0.00001
Valor inicial	25.045458	1	25.045458	108.477	0.00001
EFFECTOS PRINCIPALES	3.9415280	7	0.5630754	2.439	0.09000
Desinfectantes	2.5859922	3	0.8619974	3.733	0.04510
BLOQUE (lechuga)	1.5892986	4	0.3973246	1.721	0.21520
RESIDUAL	2.5397144	11	0.2308831		
TOTAL (CORR)	31.526700	19			

Valores igual a 0 han sido omitidos

**COMPARACION DE LAS MEDIAS POR ANALISIS DE RANGO MULTIPLE PARA EL LOGARITMO DEL NUMERO DE BACTERIAS OBTENIDO DESPUES DE LA APLICACION DE LOS DESINFECTANTES**

Método:	DESINFECTANTE	N° DE MUESTRAS	PROMEDIO	(+/- err std)	GRUPOS HOMOGENEOS
Tukey HSD					
	1	5	1.0020000	+/- 0.4730881	*
	2	5	1.3660000	+/- 0.4730881	**
	4	5	1.4120000	+/- 0.4730881	**
	3	5	2.1200000	+/- 0.4730881	*

CUADRO 10

COMPARACION ENTRE EL EFECTO DE LOS DESINFECTANTES  
SOBRE LA CARGA DE COLIFORMES TOTALES EN LAS LECHUGAS  
POR EL METODO DE CONTRASTE LINEAL

ENTRE LOS DESINFECTANTES	Nivel de Significancia
I, II, III vs IV	No Significativo
I, vs II y III	$p < 0.05$
I y II vs III	$p < 0.05$
I y III vs II	No significativo

## 2.-Análisis Bacteriológico realizado en medio acuoso a un cultivo de E.coli Fecal

Los Resultados obtenidos del Análisis Bacteriológico realizado a dos muestras de E. coli Fecal, de concentración conocida, en medio acuoso, frente a los cuatro desinfectantes de uso doméstico, recomendados para la desinfección de frutas y verduras; expresados como Número de E. coli Fecal/ml de muestra son los siguientes: Para la muestra 1, 2800 como valor inicial; 0, 1100, 1100 y 0 como valores finales para los Desinfectantes I, II, III y IV respectivamente. Para la muestra 2, 21000 como valor inicial; 0, 3900, 15000 y 0 como valores finales para los Desinfectantes I, II, III y IV respectivamente. (Cuadro 2A).

En seguida se indica la transformación logarítmica de los resultados antes descritos, misma que fue utilizada en el Análisis Estadístico: Para la muestra 1, 3.44 como valor inicial; 0, 3.04, 3.04 y 0 como valores finales para los Desinfectantes I, II, III y IV respectivamente. Para la muestra 2, 4.32 como valor inicial; 0, 3.59, 4.17 y 0 como valores finales para los Desinfectantes I, II, III y IV respectivamente. (Cuadro 2B).

El promedio del logaritmo base diez del número de bacterias de las muestras antes y después de aplicar el desinfectante fueron: 3.88 y 0, 3.88 y 3.315, 3.88 y 3.605, 3.88 y 0 para los Desinfectantes I, II, III y IV respectivamente. (Gráfica 2A).

El Análisis de Covarianza de los resultados arreglados en un diseño por bloques aleatorios, en el que los bloques (o repeticiones) fueron las dos muestras de E. coli Fecal en medio acuoso, indicó una diferencia significativa entre los desinfectantes ( $p=0.0278$ ). (Cuadro 2C)

El Análisis de Rango Múltiple por el Método de Tukey con un Nivel de Significancia del 5%, indica una diferencia entre los desinfectantes I y IV con respecto a II y III; con una diferencia promedio de 3.46. (Cuadro 2C)

Los resultados del Contraste Lineal, para comparar los efectos promedios entre los desinfectantes a base de compuestos clorados y el desinfectante a base de plata coloidal indica que no existe diferencia significativa. (Cuadro 2D).

### 3.- Evaluación de la Interferencia Vegetal

Para comparar el efecto de la presencia de la materia orgánica sobre la acción de los desinfectantes se realizó un análisis de covarianza de los resultados obtenidos del Análisis Bacteriológico para E. coli Fecal en medio acuoso y dos de los resultados, elegidos al azar, del Análisis Bacteriológico realizado en Lechuga, y se obtuvieron efectos significativos entre los desinfectantes ( $p=0.00001$ ;  $P=0.0016$ ) entre los diferentes medios (acuoso y con lechuga) y de la interacción entre desinfectantes y medio ( $p=0.0027$ ). (Cuadro 3A)

Los resultados del Análisis de Rango Múltiple por el Método de Tukey con un nivel de significancia del 5%, indica la diferencia entre los medios utilizados (acuoso y con lechuga), con una diferencia promedio de 0.63375. (Cuadro 3A)

CUADRO 2A

EVALUACION BACTERIOLOGICA DE LA INTERFERENCIA VEGETAL

EFFECTO DE LOS DESINFECTANTES SOBRE E. coli Fecal EN MEDIO ACUOSO A UNA CONCENTRACION CONOCIDA

MUESTRA	E. coli Fecal/ml	DESINFECTANTE I	DESINFECTANTE II	DESINFECTANTE III	DESINFECTANTE IV
1	INICIAL	2000	2000	2000	2000
	FINAL	0	1100	1100	0
2	INICIAL	21000	21000	21000	21000
	FINAL	0	3900	15000	0

CUADRO 2B

## EVALUACION BACTERIOLOGICA DE LA INTERFERENCIA VEGETAL

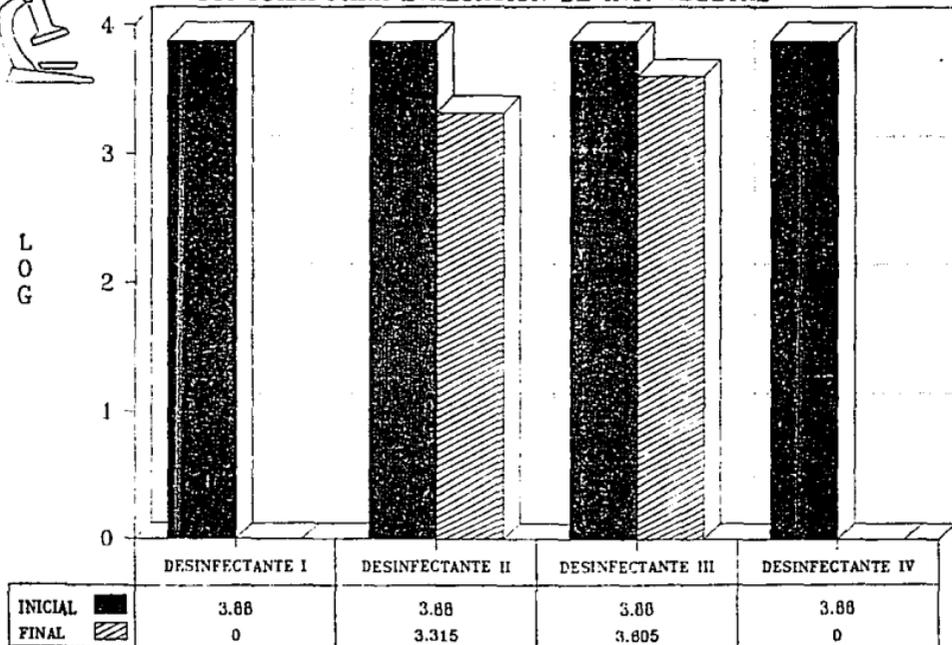
EFECTO DE LOS DESINFECTANTES SOBRE E. coli Fecal EN MEDIO ACUOSO A UNA CONCENTRACION CONOCIDA

EXPRESADA EN LOGARITMO BASE 10

MUESTRA	Log E. coli Fecal/ml	DESINFECTANTE I	DESINFECTANTE II	DESINFECTANTE III	DESINFECTANTE IV
1	INICIAL	3.44	3.44	3.44	3.44
	FINAL	0	3.04	3.04	0
2	INICIAL	4.32	4.32	4.32	4.32
	FINAL	0	3.59	4.17	0

## GRAFICA 2A

ACCION DE LOS DESINFECTANTES  
SOBRE E. COLI FECAL EN MEDIO ACUOSO A CONCENTRACION  
CONOCIDA PARA EVALUACION DE INT. VEGETAL



CUADRO 2C

ANALISIS DE COVARIANZA

DEL EFECTO DE LOS DESINFECTANTES SOBRE E. coli Fecal EN MEDIO ACUOSO EN CONCENTRACION CONOCIDA CON LOS DATOS EXPRESADOS EN LOGARITMO BASE 10

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	CUADRADOS MEDIOS	F-proporción	NIVEL DE SIG
COVARIABLES	0.3528000	1	0.3528000	1.548	0.3395
VALOR iniciales	0.3528000	1	0.3528000	1.548	0.3395
EFECTOS PRINCIPALES	24.109200	4	6.0273000	26.441	0.0368
Desinfectantes	24.027300	3	8.0091000	35.134	0.0278
BLOQUE ( <u>E. coli</u> )	0.081900	1	0.0819000	0.359	0.6154
RESIDUAL	0.4559125	2	0.2279563		
TOTAL (CORR)	24.817000	7			

Valores iguales a 0 han sido omitidos

COMPARACION DE MEDIAS POR ANALISIS DE RANGO MULTIPLE PARA EL LOGARITMO DEL NUMERO DE BACTERIAS OBTENIDO DESPUES DE LA APLICACION DE LOS DESINFECTANTES

DESINFECTANTE	N° DE MUESTRAS	Método: Nivel de Significancia de 0.05%	PROMEDIO(+/- err std)	GRUPOS HOMOGENEOS
1	2		0.000000 +/- 1.4526034 *	
4	2		0.000000 +/- 1.4526034 *	
2	2		3.315000 +/- 1.4526034 *	
3	2		3.605000 +/- 1.4526034 *	

CUADRO 20

COMPARACION ENTRE EL EFECTO DE LOS DESINFECTANTES  
FRENTE A E. coli Fecal  
EN MEDIO ACUOSO A CONCENTRACION CONOCIDA  
POR EL METODO DE CONTRASTE LINEAL

ENTRE LOS DESINFECTANTES	Nivel de Significancia
I, II y III vs IV	No Significativo

CUADRO 3A

ANALISIS DE COVARIANZA

DATOS EN LOGARITMO BASE 10 DE LA EVALUACION DE INTERFERENCIA VEGETAL TOMANDO DOS DATOS AL AZAR DEL ANALISIS BACTERIOLOGICO EN LECHUGA Y LOS DATOS DEL ANALISIS BACTERIOLOGICO A *E. coli* Fecal

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	g.l.	CUADRADOS MEDIOS	F-proporción	NIVEL DE SIG
COVARIABLES	12.735746	1	12.735746	89.278	0.00001
Valor inicial	12.735746	1	12.735746	89.278	0.00001
EFFECTOS PRINCIPALES	22.912456	4	5.7281141	40.154	0.0001
DESINFECTANTE	19.363269	3	6.4544229	45.246	0.0001
MEDIO (aq./lech.)	3.549188	1	3.5491876	24.880	0.0016
FACTORES INTERACCION	7.1097687	4	1.7774422	12.460	0.0027
DESINFECTANTE/MEDIO	7.1097687	4	1.7774422	12.460	0.0027
RESIDUAL	0.9985724	7	0.1426532		
TOTAL (CORR)	43.756544	15			

Valores igual a 0 han sido omitidos

COMPARACION DE MEDIAS POR ANALISIS DE RANGO MULTIPLE PARA EL MEDIO UTILIZADO EN LA APLICACION DE LOS DESINFECTANTES (Acuoso/Lechuga)

Método: Tukey	HSD	con	intervalo	de	95%
MEDIO	N° DE MUESTRAS		PROMEDIO (+/- err)	std)	GPOS. HOMOGENEOS
ACUOSO	2		1.7300000 +/-	0.315852	*
ORGANICO	2		2.3637500 +/-	0.315852	*

#### 4.- Determinación de principios activos

Los resultados obtenidos de la Cuantificación de Principios Activos en cada uno de los Desinfectantes son los siguientes: 0.33% de Cloro Disponible para el Desinfectante I, estipulando en la etiqueta 10% de Hipoclorito de sodio y 5% de Clorito de sodio; 2.093% de Cloro disponible para el desinfectante II, estipulando en la etiqueta 15% de Clorito de sodio, 10% de cloruro de sodio y 8% de Clorato de sodio y 2.72% de Cloro disponible para el Desinfectante III que estipula en su etiqueta sólo contenido de Dióxido de cloro estabilizado. El contenido de Plata del Desinfectante IV fue de 0.32%, estipulando en su etiqueta el contenido de Plata coloidal estable al 0.32%. (Cuadro 4).

También se muestran en este cuadro los valores estipulados en la etiqueta, por el fabricante, acerca del contenido de principios activos.

CUADRO 4

CUANTIFICACION DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE CADA DESINFECTANTE

	pH	CONTENIDO DE PRINCIPIO ACTIVO, SEGUN LA ETIQUETA	RESULTADO DE LA TITULACION	CLORO DISPONIBLE TEORICO
DESINFECTANTE I	7	HIPOCLORITO DE SODIO 10% CLORITO DE SODIO 5%	CLORO DISPONIBLE 0.33%	6.84%
DESINFECTANTE II	9	CLORITO DE SODIO 15% CLORURO DE SODIO 10% CLORATO DE SODIO 8%	CLORO DISPONIBLE 2.093%	14.61%
DESINFECTANTE III	12	DIOXIDO DE CLORO ESTABILIZADO	CLORO DISPONIBLE 2.72%	17%
DESINFECTANTE IV		PLATA COLOIDAL ESTABLE 0.32%	PLATA 0.32%	

## DISCUSION

El ensayo se realizó en Lechuga variedad romana, por ser la hortaliza de mayor consumo en estado fresco; de la cual se analizaron 5 muestras procedentes de la misma fuente y elegidas al azar.

Los desinfectantes estudiados correspondieron a aquellos de uso doméstico más frecuente, disponibles en el mercado.

Al coleccionar la muestra se evitaron contaminaciones del ambiente, tales como: polvo, tierra, saliva, descargas nasofaríngeas o de cualquier otra naturaleza; transportándose en bolsas de plástico perfectamente cerradas; procediéndose a su Análisis Bacteriológico el mismo día.

Todas las medidas de asepsia que se tomaron durante el análisis; tales como: mantener las hojas envueltas en papel aluminio flameado, sobre hielo, auxiliarse de material estéril y procurar un ambiente también estéril se hicieron a fin de evitar cambios tanto cualitativos como cuantitativos; ya que las cifras se podían alterar dando mayores a las originales debido a la proliferación de microorganismos o menores si hubiera presentado un efecto antagónico de algún grupo de gérmenes.

Se eligió el método de Número Más Probable (NMP) ya que es fácil y simple de realizar, permite emplear medios selectivos y diferenciales, para E. coli y que es muy útil cuando las muestras contienen pocos microorganismos; aunque requiera mayor espacio para la incubación que el método de Recuento en Placa ya que el número de diluciones se hizo hasta  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$  ocupando para esto mayor cantidad de material.

Se eligió como diluyente agua peptonada al 0.1%, por ser fácil de preparar y conservar bien a los m.o. en dilución, debiéndose esperar 15 min después de hacer la dilución para permitir la reactivación de los m.o., a fin de obtener así cuentas reales en el número de bacterias sobrevivientes, como se indica en la literatura (32), ya que existen otros diluyentes tales como: agua de grifo, agua destilada, solución salina fisiológica, solución Ringer, que no se recomiendan por ser tóxicos para algunos m.o. (32).

Los desinfectantes se probaron a tiempos y dosis recomendados por el fabricante a fin de saber si estos eran realmente eficaces en la desinfección en la dosificación señalada, por lo que se llevó a cabo el lavado de las hojas de lechuga previo a la exposición con los desinfectantes para simular un tratamiento doméstico completo.

La neutralización del desinfectante, pasado el tiempo de exposición indicado, se llevó a cabo para hacer válida la prueba al evaluar el producto, ya que de otra forma el remanente seguiría actuando durante el período de incubación, disminuyendo el número final de m.o.

Los desinfectantes fueron probados frente a una concentración de E. coli fecal conocida con la idea de conocer si la presencia de la lechuga influye en los resultados finales.

Se eligió E. coli Fecal como m.o. de prueba ya que su presencia en la lechuga es posible, debido a la contaminación de que es objeto ésta antes de ser comercializada.

En el Análisis Bacteriológico realizado con la concentración conocida de E. coli Fecal, los desinfectantes se utilizaron a tiempos y dosis recomendados por el fabricante para la desinfección de agua con el fin de no salirnos de los parámetros establecidos, y seguir probando si el tratamiento recomendado es el indicado para una desinfección eficaz.

La dosis de E. coli Fecal se eligió en base a un estudio previo sobre la carga inicial que contienen las lechugas.

La determinación de principios activos se realizó para saber si el producto contiene lo que marcan en su etiqueta, o si está presente en mayor o menor concentración; las técnicas utilizadas para las determinaciones fueron: el método Yodométrico, que se basa en la propiedad del hipoclorito de poner en libertad el cloro en presencia de ácido:



y si ese cloro se hace actuar sobre yoduro de potasio, donde el yodo que se libera:



puede ser cuantificado con una solución de tiosulfato de sodio:



indicando la cantidad de cloro desprendido por el hipoclorito, o sea el llamado cloro activo.

Se usa como indicador engrudo de almidón, el cual se añade cuando se ha titulado la mayor parte del yodo y la solución presenta una coloración amarillo paja; el final de la titulación lo indica la desaparición del color azul; el almidón reacciona con el yoduro a grandes diluciones, en presencia de yoduro de potasio, dando una coloración azul intensa debida al complejo de adsorción:



KI            Coloración azul

Los cálculos se realizan tomando en cuenta que cada ml de tiosulfato de sodio 0.1N consumido es equivalente a 3.723mg de Hipoclorito de sodio (NaOCl) y si se desea calcular el cloro disponible se considera que cada ml de tiosulfato de sodio 0.1N consumido es equivalente a 3.545mg de cloro disponible;

- y el Método Directo, según Volhard para la determinación de Plata, que se fundamenta en que cada gota de solución de sulfocianuro produce una coloración rojiza de sulfocianuro férrico:



La coloración desaparece en virtud de que, en tanto haya iones plata en la solución se formará sulfocianuro de plata, que es menos soluble que el fierro:



El sulfocianuro férrico, que es el que imparte a la solución la coloración rojiza, permanecerá sin disolverse cuando se haya llegado al final de la titulación.

Aún cuando el sulfocianuro férrico tiene un color rojo sangre, al final de la reacción la solución sólo presenta una coloración débilmente rojiza, en virtud del ligero exceso que sólo debe haber de sulfocianuro.

Los cálculos se hacen tomando en cuenta que 1 ml de KSCN 0.1N=0.10787g Ag.

Del Análisis Bacteriológico realizado a cinco lechugas variedad romana, se encontró que la contaminación presente en sus hojas (post-lavado) va desde 3.6 hasta 110,000 colif/g de muestra; lo que indica que el lavado no es suficiente para la ingestión en crudo de ésta hortaliza, pudiendo afectar la salud de las personas, por lo que se recomienda que aparte de un buen lavado de sus hojas se enfrente a un desinfectante, a fin de seguir reduciendo la carga microbiana.

La contaminación final de las hojas de lechuga (post-tratamiento) indican que a pesar de enfrentar las hojas de lechuga a un desinfectante a dosis y tiempos recomendados por los fabricantes la carga microbiana no es reducida a niveles de contaminación aceptables, por lo que se recomienda duplicar tanto la dosis como el tiempo de exposición de éstas hojas frente al desinfectante, para reducir lo más posible la contaminación final, ya que como lo indica la literatura (4, 27 y 30) la eficiencia de los desinfectantes aumenta al aumentar la concentración del desinfectante y el tiempo de exposición.

Del análisis de covarianza obtenemos con un nivel de significancia del 5%, de los datos obtenidos del Análisis Bacteriológico realizado en lechuga, que la carga inicial en cada lechuga es muy variable ( $P < 0.00001$ ) ya que la contaminación de que son objeto las lechugas durante su cultivo y su recolección no es uniforme; y que existe diferencia entre los desinfectantes en cuanto a su poder germicida ( $P < 0.0451$ ) ya que la composición de estos es diferente.

Por un análisis de rango múltiple, por el método de Tukey, encontramos que la diferencia principal está entre los desinfectantes I y III ( $P < 0.05$ ) ya que la unión de hipoclorito y clorito de sodio en el caso del desinfectante I tienen mayor potencia germicida que el dióxido de cloro contenido en el desinfectante III.

Del análisis estadístico por Contraste Lineal obtenemos que no existe diferencia entre los desinfectantes clorados y el desinfectante a base de plata coloidal ya que por lo menos un desinfectante clorado tiene la misma eficacia que el desinfectante a base de plata coloidal.

Del análisis de covarianza con un nivel de significancia de 5%, del Análisis Bacteriológico realizado a dos muestras de E.coli Fecal en medio acuoso, obtenemos que existe diferencia entre los desinfectantes, para un nivel de significancia de  $P < 0.0278$  mostrando que tanto en medio acuoso como en presencia de materia orgánica los desinfectantes actúan en forma diferente.

En el análisis estadístico de Rango Múltiple, encontramos que la diferencia se encuentra entre los desinfectantes I y IV, con respecto a II y III para el medio acuoso, donde I y IV muestran un mayor poder germicida concordando con los resultados anteriores.

Del análisis estadístico con un nivel de significancia del 5%, con 2 de los datos elegidos al azar, del análisis bacteriológico llevado a cabo en lechuga y los 2 datos del análisis bacteriológico sobre E. coli Fecal en medio acuoso, obtenemos que: existe diferencia entre los medios (acuoso y con lechuga) para un nivel de significancia de  $P < 0.0016$ , lo que se corrobora con el análisis estadístico de rango múltiple, por el método de Tukey.

El que no existiera diferencia en general entre los desinfectantes clorados al estar presente la lechuga y al no estarlo, puede ser debida a que los desinfectantes II y III son igualmente poco eficientes en presencia de materia orgánica y sin ésta.

El que exista diferencia para el desinfectante IV, no significa que exista interferencia por materia orgánica, ya que en presencia de ésta, siempre se obtuvieron resultados poco satisfactorios; puede ser debido a la diferente concentración y tiempo recomendados para la desinfección de agua que para la desinfección de hortalizas, sería conveniente aumentar la dosis indicada en la etiqueta.

Los resultados de la cuantificación de principios activos de cada desinfectante concuerda con lo descrito en la literatura (4) en cuanto a que el almacenamiento de los desinfectantes clorados lleva a una inestabilidad, siendo esto una de sus desventajas, para tratar de controlar esta desventaja sería recomendable dar una fecha de caducidad a todos los desinfectantes a base de compuestos clorados.

El contenido de plata experimental para el desinfectante IV es de 0.32%, lo que está de acuerdo con lo establecido en la etiqueta; resultando así el único desinfectante de los cuatro estudiados que contiene realmente lo establecido en su etiqueta.

## CONCLUSIONES

Después de analizar el presente trabajo las conclusiones son las siguientes:

-Las lechugas tal como son expandidas presentan una carga elevada de Coliformes, y por ende un peligro potencial de encontrarseles microorganismos patógenos de origen intestinal, relacionado tal vez al riego con aguas negras, común en México, o al uso de fertilizantes orgánicos no depurados que llegan al vegetal en forma directa o indirecta a través del suelo.

-Por lo marcado anteriormente, se recomienda el lavado en forma exhaustiva de los alimentos que se ingieran crudos antes de ser puestos en contacto con desinfectantes recomendados para la desinfección de frutas y verduras.

-De acuerdo a los resultados obtenidos, el desinfectante con mayor eficacia, a tiempo y dosis recomendados por el fabricante es el desinfectante I (a base de hipoclorito y clorito de sodio) dentro de los clorados y comparado aún con el desinfectante IV a base de plata coloidal.

- Ninguno de los desinfectantes de uso común presentan una afectividad germicida ideal frente a la lechuga, con tiempo y dosis recomendados por el fabricante, para ser considerado como un desinfectante ideal.

-Debido a lo anterior, se recomienda usar los desinfectantes, a tiempos y dosis dobles que los recomendados por el fabricante, pues aunque no se hayan realizado los experimentos pertinentes, la literatura (4,19,30) respalda que la acción del desinfectante se verá elevada si se aumenta el tiempo de contacto y la concentración, no llegando aún así a dosis tóxicas para el hombre (13)

-Los desinfectantes a base de plata coloidal e hipoclorito y clorito de sodio presentan una eficiencia germicida adecuada para agua a dosis y tiempo recomendado por el fabricante, con lo que se comprueba que la presencia de materia orgánica afecta la acción de los desinfectantes a base de compuestos clorados.

-El único desinfectante que presenta la concentración de principio activo establecida en su envase es el desinfectante a base de plata coloidal; por esto y por la acción presentada tanto frente a lechuga como en ausencia de la misma se le recomienda como el mejor desinfectante para frutas y verduras de uso doméstico.

## A N E X O S

### Preparación de Indicadores

ENGRUDO DE ALMIDON.- Se pesaron 0.2g de almidón y se mezclaron en un mortero de porcelana con 0.001g de yoduro de mercurio (conservador), se agregó agua hasta formar una pasta homogénea, la cual se diluyó con 15ml de agua y se vertió poco a poco en 100ml de agua hirviendo; se dejó en ebullición por 4 minutos más y se dejó enfriar. Se decantó la solución y se conservó en un frasco de vidrio. (23)

ALUMBRE DE FIERRO Y AMONIO.- A una solución saturada de alumbre de fierro y amonio se le agrega ácido nítrico al 30% hasta lograr su decoloración (aproximadamente 8g en 100ml). (23)

### Preparación y Estandarización de patrones primarios

TIOSULFATO DE SODIO.- Se disolvieron aproximadamente 55g de tiosulfato de sodio pentahidratado ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) en dos litros de agua destilada, recién hervida y enfriada. (2, 3, 23)

Se estandarizó de la siguiente manera: se pesaron 105mg de dicromato de potasio (patrón primario), previamente pulverizado y secado a  $120^\circ\text{C}$  durante 4hrs, y se disolvieron en 50ml de agua destilada en un matraz erlenmeyer. Se agitó para disolver el sólido y se agregaron 1.5g de yoduro de potasio (KI) y 1g de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) más 2.5ml de ácido clorhídrico (HCl). Se tapó el matraz y se dejó reposar por 10 minutos.

Pasados los 10min se lavaron las paredes del matraz con un poco de agua destilada y se tituló el yodo liberado con la solución de tiosulfato de sodio, hasta lograr una coloración verde amarillenta. Se adicionaron 3ml de almidón y se continuó la titulación hasta la desaparición del color azul. Se calculó la normalidad, tomándose en cuenta que 0.04903 g de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) es igual a 1ml de solución de tiosulfato de sodio 0.1N.

**SULFOCIANURO DE POTASIO.**- Se disolvieron 1.1066g de KSCN en 250ml de agua destilada. (23)

Para la titulación de una solución de KSCN se empleó una solución valorada de nitrato de plata; para lo cual se midieron en una pipeta volumétrica 25ml de la solución de nitrato de plata 0.01N y se diluyeron con agua destilada hasta 100ml en un matraz erlenmeyer. Como indicador se utilizó 1ml de alumbre amónico-férrico. La solución de sulfocianuro se colocó en una bureta, y se dejó caer lentamente y agitando el matraz, a la solución de nitrato de plata. Se tomó como final de la titulación la coloración permanentemente rojiza dada por el sulfocianuro férrico. Se calculó la normalidad por medio de la fórmula  $N_1V_1=N_2V_2$ . (23)

**NITRATO DE PLATA.**- Se disolvieron 0.1462g de nitrato de plata, previamente secado a  $150^{\circ}C$  durante 1 hora, en 250ml de agua destilada. Se guardó en frasco de vidrio color ámbar. (23)

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- ADAMS M.R., HARTLEY, and COX A. D.: Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. Food Microbiology 6(2) 69-77. (1989).
- 2.- ARANEO: Química Analítica Cuantitativa. McGraw Hill. Bogotá Colombia. pp 162-164, 334-336, 414, 415. (1981).
- 3.- AYRES: Análisis Químico Cuantitativo Harla. 2a. edición, Impreso en México, pp 233. (1983).
- 4.- BANWART: Microbiología Básica de los Alimentos. Ballarta S. A. España, pp 11-17, 21, 23-25, 37, 92, 97, 106-107, 110, 187-190, 221-230, 292, 299-302, 357-360. (1989).
- 5.- BARRETTE, HANNIN D., WHEELER and HURTS J. K.: General Mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: Abolition of ATP production. Biochemistry 28(23):9172-9178, (1989).
- 6.- BENSON S. W.: Cálculos químicos ITMUSA, 11a. impresión, México (1985).
- 7.- BERG J. D. and HOFF J. C.: Resistance of bacterial populations to disinfection by chlorine dioxide. Journal American Water Works Association 80 (9) 15-119, (1988).
- 8.- BEUCHAT L. R. and BRACKETT R. E.: Survival and growth of Listeria monocytogenes on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment modified atmosphere packaging and temperature. Journal of Food Science. 55(3): 755-758, 870. (1990).

- 9.- BLOOMFIELD S. F. and MILLER E. A.: A comparison of hypochlorite and phenolic disinfectants for disinfection of clean and soiled surfaces and blood spillages. Journal Hospital Infections. 13(3): 231-240. (1989).
- 10.- FRAIZER W. C. and WESTHOFF D. C.: Microbiología de los Alimentos. Acriba. 3a. edición Española. Traducida por el Dr. José Tormo Iguacel. pp 44-73, 190-197. (1988).
- 11.- GONZALEZ D.B., FERNANDEZ-CUESTA, LEON M. P. y MORENO E.: Estudio Microbiológico sobre lechugas. Influencia del lavado en agua con o sin adición de hipoclorito sódico comercial. Alimentaria, Septiembre (1987).
- 12.- GONZALEZ M.B., LEON M.P., FERNANDEZ C.D. y MORENO E.: Incidencia de Patógenos potenciales (Salmonella, E. coli) y oportunistas (Pseudomonas) en vegetales frescos. Alimentaria, Septiembre (1987).
- 13.- GOSSELIN, HODGE, SMITH and GLEASON: Clinical toxicology of Commercial Products. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 4th edition. pp Secc III 101, 174-176, 251. (1985).
- 14.- HARAKH S., ILLESCAS A., MATIN, A.: Inactivation of bacteria by purogene. Journal of Applied Bacteriology. 64(5) 459-463 (1988).
- 15.- HART F. L. and FISHER H. J.: Análisis Moderno de los Alimentos. Acriba. Zaragoza, España. pp 270, 504. (1986).

- 16.- KAISER S. L., BARRERA DE LA M. S. y FLORES L.: Evaluación de tres grupos de bactericidas utilizados en la industria de los alimentos. Revista Alimentos, 8(3): 11-16. (1983)
- 17.- KING A. D. Jr, MAGNUSON J. A., TÓRÓK T. and KIAN N. G.: Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. Journal of Food Science. 56(2): 459-461. (1991).
- 18.- KIRK-OTHMER: Enciclopedia de tecnología química. Hispano-Americana. 1a. edición. México. Tomos IV, VI y XII. (1979).
- 19.- LOPEZ V.L., ROMERO R.J. y URBINA J.: Eficiencia de los desinfectantes en vegetales y frutas. Alimentos, 13(1), 25-30. (1988).
- 20.- MARIS P. C.: Study of the influence of water temperature and hardness on the activity of disinfection. Recl. Med. Vet. Ec Aifort. 165(11): 891-894. 1989.
- 21.- MARVIN L. S.: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Intersociety/ Agency Commite on microbiological examination of foods. Editor USA. pp 428. (1988).
- 22.- Official Methods of Analysis (AOAC). 40th. edition, pp 76, 87, 660, 669, 942-946, 951. (1984).
- 23.- OROZCO D. F.: Análisis Químico Cuantitativo Porrua S.A., 17ava. edición. México, pp 66, 67, 204-207, 263-271, 274-279, 342-345, 350, 358-359. (1987)
- 24.- POTAPCHENCO N.G., and ERUSALIMSKAYA L. F.: Selecting a method for the determination of Escherichia coli sensitivity to the action of silver. Microbiology 51 (3): 81-84. 1989.

- 25.- PREVIDI M. P. and VICINI E.: Non-logarithmic inactivation of bacteria isolated from post-process leakage by sodium hypochlorite. Microbiologie-Aliments-Nutrition, 8(1) 31-37 (1990).
- 26.- Programa Universitario de los alimentos.: Microbiología de los alimentos. UNAM. 28 al 10. de Julio de 1990.
- 27.- REX O. A.: Desinfectantes en la industria de los alimentos. Alimentos, 6(3): 43-46. (1981).
- 28.- RUSELL A. D.: Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. Blackwell Scientific Publications, pp 3-6, 59-61, 70, 107-128, 134-137. (1982).
- 29.- SECRETARIA DE SALIBRIDAD Y ASISTENCIA, SUBSECRETARIA DE SALUBRIDAD, DIRECCION GENERAL DE LABORATORIOS DE SALUD PUBLICA. Técnicas Generales para Análisis Microbiológico de Alimentos. México 1979.
- 30.- SEYMOUR S. B.: Disinfection, Sterilization, and Preservation. 2nd. edition. Lea and Febiger. Philadelphia U.S.A. pp 167-195, 395-407. (1977).
- 31.- SHARMA R.K., KUMAR S., RAMTEKE and RAY P.K.: Disinfection of drinking water filtration through silver impregnated alumina. Journal of Environ Science Health Part a Environ Science England, 25(5): 479-486. 1989.
- 32.- Statgraphics. Ed. Statical Graphics Corporation S/A. (1986).
- 33.- THATCHER F. S. y CLARK D. S.: Análisis Microbiológico de los alimentos. Acriba Zaragoza, España, pp 32-39, 82-93. (1973).

- 34.-The Unites States Pharmacopeia. The National Formulary  
Official from January, USP XXII, NF XVII. (1990).
- 35.- VEWRVILLE, KATHLEEN M. and HERSON S.D.: The effect of  
free chlorine on Escherichia coli populations. Current of  
Microbiology. 18 (4): 235-242. 1989.
- 36.- WAYNE W.D.:Bioestadística LIMUSA, 6a.reimpresión, México pp  
193-229. (1985).
- 37.- WONDERGEM E. and DIJK-LOOUJAARD A. M. van.:Chlorine dioxide  
as a post-disinfectant for Dutch drinking water. Science of  
the total Enviroment.102, 101-112. (1991).