



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Comparación de la actividad antimicrobiana de tres diferentes marcas de sanitizantes de Hipoclorito de sodio, con respecto al sanitizante de la marca líder en México, que es utilizado en el Laboratorio I planta alta de la UMIEZ de la FES Zaragoza.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

Gómez Hernández Carlos Alberto

Director de tesis: Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara.

Asesor de tesis: Mtra. Yolanda Flores Cabrera.

México, D.F. Febrero 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Cuando alguien que en verdad necesita algo, lo consigue, no es la casualidad la que lo pone en su camino, si no él mismo.

(HERMANN HESSE)

DEDICATORIA

Dedico este trabajo y el esfuerzo realizado durante todo este tiempo, a las personas más importantes en mi vida, mi familia, que gracias a su apoyo incondicional me brindaron la oportunidad de alcanzar esta gran meta.

A mi madre Martha Hernández, por esa comprensión, cariño, apoyo y amor que me ayudo a seguir adelante aun en los peores momentos y a ser una mejor persona día con día. A mi padre Rutilio Gómez quien con su esfuerzo y confianza me dio la fuerza para levantarme de cada tropiezo, siendo un ejemplo de valores que hoy son las bases con las que guio el camino de mi vida.

A mis hermanas, Jazmín y Cecilia Gómez, los pilares que nunca me permitieron derrumbarme y que siempre estuvieron a mi lado aun en los momentos más difíciles y que aun siendo menores, he aprendido demasiado de ellas.

A Nancy Ríos que vivió esta historia a mi lado y nunca dejó de creer en mi, apoyándome en los peores momentos, brindándome más cariño del que merecía y sin esperar nada a cambio, gracias por haber estado junto a mí en este camino, estoy en deuda. Te quiero.

A mis grandes amigos y compañeros que han estado junto a mí a lo largo de todo este recorrido y de quienes he aprendido demasiado, Hugo y Bruno Barrera, Álvaro y Samuel Tenorio, Roberto Olvera, Alejandro Perdomo, Benjamín, Irene Nieto, Wendy Martínez, Alicia Luna, Christian Sierra, por mencionar algunos, les agradezco su tiempo, consejos, cariño y experiencias que son invaluablees y que permanecerán dentro de mi para toda la vida.

A mi universidad, mi segunda casa, que me brindó la oportunidad de formarme como profesional en esta gran carrera que amo, siempre donde este y a donde valla te llevare con orgullo y en mi corazón.

Orgullosamente UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores José Luis Alfredo Mora Guevara y Rubén Marroquín Segura, a la Mtra. Yolanda Flores Cabrera, les agradezco el tiempo, conocimientos y todo el apoyo que me brindaron para la realización de este proyecto, así como los excelentes momentos que pase en el laboratorio a su lado, por este tiempo invaluable y que recordare durante toda la vida. Gracias.

A mis sinodales, gracias por su tiempo y sus consejos que enriquecieron mi proyecto.

Gracias a los que después de todo este tiempo siguen a mi lado, a los que hoy ya no están conmigo, a los que nunca dejaron de creer en mí y a los que durante el camino, dejaron de hacerlo, porque de cualquier forma construyeron conmigo este sueño, que hoy se convierte en una realidad y en el comienzo de nuevas metas y objetivos, que de igual manera, los veremos cumplir juntos.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	7
2.	MARCO TEÓRICO.....	8
2.1.	Limpieza y desinfección.....	8
2.1.1.	Agentes de limpieza.....	10
2.1.2.	Realización.....	6
2.2.	Desinfectantes.....	11
2.2.1.	Clasificación.....	11
2.2.2.	Selección de desinfectantes.....	13
2.2.3.	Mecanismos de acción de los agentes desinfectantes.....	16
2.2.3.1.	Mecanismos de acción de los agentes desinfectantes.....	16
2.2.3.2.	Agentes que desnaturalizan proteínas.....	18
2.2.3.3.	Agentes que modifican los grupos funcionales y ácidos nucleicos.....	19
2.2.4.	Niveles de desinfección.....	23
2.2.5.	Factores que afectan la efectividad del proceso de desinfección.....	23
2.3.	Hipoclorito de sodio.....	25
2.3.1.	Identidad de la sustancia química.....	25
2.3.2.	Descripción.....	25
2.3.3.	Propiedades fisicoquímicas.....	26
2.3.4.	Propiedades químicas.....	26
2.3.5.	Incompatibilidades.....	29
2.3.6.	Actividad microbicida y diluciones recomendadas para su uso.....	30
2.3.7.	Precauciones.....	31
2.4.	Valoración del Hipoclorito de sodio.....	32
2.5.	Microorganismos comunes en superficies.....	33
2.5.1.	Microorganismos control.....	33
3.	NMX-BB-040-SCFI-1999.....	34
3.1.	Objetivo.....	34
3.2.	Campo de aplicación.....	34
3.3.	Fundamento.....	34
3.4.	Microorganismos a prueba.....	34
3.4.1.	<i>Escherichia coli</i>	34
3.4.1.1.	Morfología.....	35
3.4.1.2.	Cultivo.....	35
3.4.1.3.	Patogénesis.....	35
3.4.2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	36
3.4.2.1.	Morfología.....	36
3.4.2.2.	Cultivo.....	37
3.4.2.3.	Patogénesis.....	37

4.	USOS EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE ESTUDIO SUPERIORES ZARAGOZA	38
5.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
6.	OBJETIVOS.....	40
6.1.	General	40
6.2.	Particulares.....	40
7.	HIPÓTESIS.....	40
8.	MATERIAL Y MÉTODOS	41
8.1.	Tipo de estudio	41
8.2.	Criterios	41
8.2.1.	Inclusión	41
8.2.2.	Exclusión.....	41
8.3.	Variables	42
8.3.1.	Dependientes	42
8.3.2.	Independientes.....	42
8.4.	Material y equipo	42
8.5.	Medios y reactivos.....	43
8.6.	Material biológico.....	43
8.7.	Métodos	43
8.7.1.	Preparación y acondicionamiento de la muestra	43
8.7.2.	Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba.....	44
8.7.3.	Determinación de la cuenta viable inicial.....	44
8.7.4.	Preparación de las diluciones de los sanitizantes a emplear.....	45
8.7.5.	Determinación de las células sobrevivientes.....	46
8.7.6.	Porcentaje de reducción.....	47
9.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
9.1.	Determinación de células sobrevivientes NMX-BB-040-SCFI-1999	48
9.1.1.	Montaje de la técnica	48
9.1.2.	Determinación de células sobrevivientes. <i>Escherichia coli</i>	51
9.1.3.	Determinación de células sobrevivientes. <i>Staphylococcus aureus</i>	53
10.	CONCLUSIÓN.....	56
11.	RECOMENDACIONES.....	56
12.	REFERENCIAS.....	57
	GLOSARIO.....	60
	ANEXOS	61

1. INTRODUCCIÓN.

El cloro fue descubierto, en su estado gaseoso, por el químico sueco C.W. Scheeldeen en 1774, para 1810 se le identificó como elemento químico por Sir Humphrey Davy, y fue algunas décadas después cuando se descubrió su efecto desinfectante. Las primeras referencias al uso del cloro en la desinfección, datan durante un corto período de tiempo en Inglaterra, en el año 1854, combatiendo una epidemia de cólera y como antiséptico el hipoclorito sódico fue utilizado por primera vez a gran escala en Inglaterra en 1897 para la desinfección de residuos tras una epidemia de fiebre tifoidea y finales de siglo se empezó a utilizar también para desinfectar las manos de los médicos antes de las intervenciones quirúrgicas.¹

En la industria farmacéutica se utilizan desinfectantes para eliminar la carga microbiana, por lo tanto la desinfección es un proceso crítico en las áreas de producción donde se demanda la utilización de un control y regulación de todas las posibles áreas de contaminación, por lo que deben ser rigurosamente controladas.² Dado que en la FES Zaragoza se imparte la carrera de QFB y se tienen los laboratorios experimentales de Microbiología General para las prácticas de los alumnos con microorganismos, es necesario un control adecuado de la limpieza y sanitización en las áreas de trabajo, siendo el hipoclorito de sodio el sanitizante comúnmente utilizado, es por ello que al evaluar la actividad antimicrobiana del sanitizante de la marca líder en México, la cual es utilizada en estos laboratorios, y al comparar su eficacia contra otras tres marcas diferentes de Hipoclorito de sodio, se busca demostrar experimentalmente que estos cumplen con su función, eliminando el 99.99% de los microorganismos y así poder sustituir a el sanitizante de la marca líder por uno de menor costo e igual eficiencia.

Para lograrlo se utilizó la norma NMX-BB-040-SCFI-1999 de métodos generales de análisis determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas, realizando la evaluación las cepas de *Escherichia coli* ATCC 6538 y *Staphylococcus aureus* ATCC 11229, realizando una cuenta viable inicial de

Unidades Formadoras de Colonias (UFC) que fue comparada con las células sobrevivientes de la cepa al estar en contacto 30 segundos con el sanitizante.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1. Limpieza y desinfección

Comúnmente se considera a la limpieza y la desinfección como conceptos sinónimos, la realidad es que se trata de operaciones diferentes y complementarias. La limpieza es el proceso mediante el cual se logra la eliminación de la suciedad en las superficies aplicadas, y la desinfección es el proceso de eliminación de microorganismos no deseables.³

La limpieza y la desinfección son procedimientos de gran importancia, ya que permiten controlar la presencia de microorganismos sobre las superficies. En los laboratorios de investigación estos procesos deben realizarse de rutina, ya que el trabajar con microorganismos exige que se tomen medidas para evitar la contaminación del ambiente, el material de trabajo y del personal. Si hablamos de la industria farmacéutica; la limpieza y la desinfección tienen como finalidad eliminar los desechos y materiales que se han depositado sobre las superficies y reducir o eliminar los microorganismos presentes en los equipos, pisos o techos de la misma. Por tal razón, la limpieza y la desinfección no deben considerarse como el último paso en la manufactura de un producto, sino como el primer paso en la elaboración del siguiente lote.⁴

Limpieza es la eliminación de la suciedad visible (por ejemplo, material orgánico e inorgánico) de los objetos y las superficies y, normalmente, se lleva a cabo manualmente o mecánicamente usando agua con detergentes o productos enzimáticos. Una limpieza a fondo es esencial antes de la desinfección de alto nivel y la esterilización porque los materiales inorgánicos y orgánicos que permanecen en las superficies de los instrumentos interfieren con la eficacia de estos procesos.⁵

Desinfección describe un proceso que elimina a gran parte o todos los microorganismos patógenos, excepto las esporas bacterianas, sobre objetos inanimados. En los entornos de atención de salud, por lo general los objetos son desinfectados con productos químicos. Los factores que afectan a la eficacia de la desinfección, incluye la limpieza previa del objeto; carga orgánica e inorgánica presente; tipo y nivel de contaminación microbiana; concentración y tiempo de exposición al germicida.⁵

2.1.1. Agentes de limpieza

La adherencia de residuos a la superficie de fabricación y de áreas es un fenómeno físico que no puede evitarse, para eliminar estos residuos se emplean agentes de limpieza, los cuales son sustancias con valores de Dosis Letal (DL) 50 no críticos.⁶

Clasificación de los agentes de limpieza por su estructura química.⁴

- a)** Constructores: Polifosfatos, fosfonatos, gluconatos, citratos, etilendiaminotetracéticos (EDTA), nitrilotriacetato (NTA).
- b)** Surfactantes compuestos cuaternarios de amonio.
- c)** Agentes complejantes: Nitrilotriacetato, o Etilendiaminotetracético.
- d)** Agentes secuestrantes: Fosfonatos, polifosfonatos.
- e)** Desespumantes: Etoxilados de óxido de propileno.
- f)** Agentes oxidantes: Donadores de oxígeno e hipocloritos.
- g)** Inhibidores de corrosión: Silicatos, carbohidratos modificados y fosfonatos.
- h)** Soluciones ácidas diluidas, ejemplos: Solución de ácido clorhídrico.
- i)** Soluciones alcalinas, ejemplos: Solución de hidróxido de sodio.
- j)** Solventes, ejemplos: etanol, propanol.

2.1.2. Realización

Se recomienda que la limpieza se realice:⁷

- Realizar de forma ordenada, desde las áreas más limpias a las menos limpias.
- Realizar la operación en trazos paralelos con pequeño ángulo de inclinación que evite recontaminar las áreas limpias.
- Elegir un paño con la superficie suficiente para asegurar que toda el área sea limpiada.
- Doblar el paño para producir una presión más uniforme de mano y dedos.
- Cambiar la superficie del paño al inicio de cada trazo o línea.

La técnica a emplear para la limpieza y desinfección de superficies planas es la de arrastre.⁸

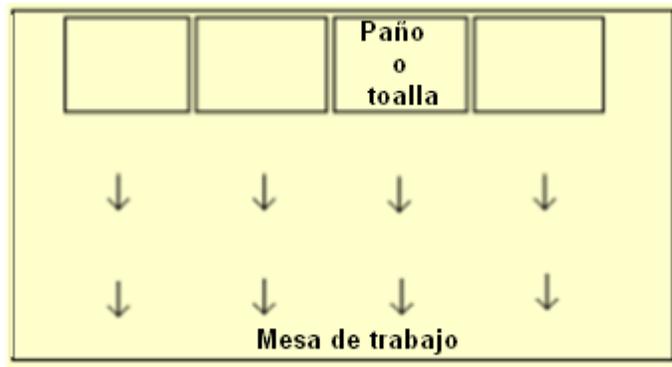


Figura 1. Consiste siempre en limpiar de arriba hacia abajo en un sólo sentido, evitando repetir el paso del paño varias veces por el mismo sitio. Es importante hacer énfasis en lugares donde pueda quedar la suciedad acumulada.

2.2. Desinfectantes

Se le denomina desinfectante a la sustancia o mezcla de sustancias químicas utilizadas para matar microorganismos, pero no necesariamente elimina esporas, generalmente suelen aplicarse a superficies u objetos inanimados.⁹

2.2.1. Clasificación

Los desinfectantes matan o inhiben la multiplicación de los microorganismos por medio de diferentes mecanismos de acción (Cuadro 1), con frecuencia se producen alteraciones secuenciales o simultáneas que dificultan la diferenciación entre los efectos primarios y secundarios. Algunos de estos cambios lesionan la membrana celular, otros inactivan de forma irreversible las proteínas y varios inducen un daño profundo en ácidos nucleicos, en general los efectos observables de los desinfectantes sobre los microorganismos son resultado de las alteraciones en sus compuestos macromoleculares.¹⁰

Cuadro 1. Clasificación y mecanismos de acción de los desinfectantes.¹¹

C L A S I F I C A C I Ó N		MECANISMO DE ACCIÓN
Halogenados	• Yoduros	Oxidación de componentes bacterianos y precipitación de proteínas.
	• Cloruros (Hipoclorito de sodio)	Desnaturalización proteica.
Gases	• Óxido de Etileno	Inhibición irreversible de enzimas celulares.
Metales pesados	• Plata	Reacción con los grupos SH de las proteínas microbianas, inhibiendo la actividad de los sistemas enzimáticos.
	• Mercurio	
Oxidantes	• Peróxido de hidrógeno	Producción de oxígeno molecular por la acción de catalasas tisulares.
	• Ac. Peracético	
Alcoholes	• Etanol 70%	Desnaturalizan proteínas, disuelven lípidos, alteran permeabilidad de las membranas.
	• Isopropanol 70%	
Fenoles	• Triclosán	Disrupción de la membrana plasmática, desnaturalización de enzimas, rompe enlaces químicos de proteínas y nucleoproteínas.
	• Resorcinol	
	• Eugenol	
Ac. Orgánicos	• Ácido cítrico	Inhibición de metabolitos.
Compuestos Cuaternarios de Amonio	• Detergentes	Alteración de la integridad de la membrana, y facilitación del arrastre mecánico del material contaminado. Inhiben enzimas.
Aldehídos	• Glutaraldehído	Alquilación de proteínas a pH alcalino.
	• Formaldehído	Desnaturalización protéica a pH alcalino.

2.2.2. Selección de desinfectantes

En el proceso de selección de desinfectantes el primer criterio por considerar es el campo de aplicación y el nivel de desinfección que se pretende lograr. En ese proceso deberán incluirse los siguientes aspectos:

- Definición de las características del desinfectante.
- Criterios de evaluación del producto.
- Bases de evaluación de las características.

Definición de características del desinfectante.¹²

Este aspecto establece una base para relacionar las características de calidad y actividad del producto. Las características por analizar son:

1. **Ingrediente activo-concentración.** Característica que permite conocer el nombre genérico del producto, principio activo y su contenido en el producto. De esta forma se establece una comparación entre valores reportados por la casa comercial y la evidencia científica en relación con la acción antimicrobiana del producto y otras características como su acción residual.
2. **Actividad antimicrobiana.** Es la capacidad que tiene el producto para eliminar microorganismos. En este deben considerarse los niveles de desinfección esperados alto, intermedio, bajo y el área de aplicación del mismo.
3. **Descripción del producto.** Permite evaluar las características físicas como color, olor, aspecto, solubilidad, homogeneidad, presentación, cantidad de producto por unidad de envase y sus indicaciones de uso.
4. **Valoración por autoridad competente.** Documentación avalada por la autoridad reguladora competente.
5. **Estabilidad.** Tiempo de vigencia durante el cual el producto permanece activo. Los cambios que sufra la sustancia en almacenamiento deben ser mínimos, con el fin de que no pierda su acción.

6. **Biodegradabilidad.** Es la inocuidad del producto frente al medio ambiente. Y este se define como el porcentaje de degradación del producto por unidad de tiempo.
7. **Compatibilidad con las superficies.** Se relaciona con los efectos adversos que pueda tener el producto sobre los materiales en los que se aplica o que entran en contacto con el mismo.
8. **Datos de seguridad.** Relacionados con los factores de riesgo que se generan durante el manejo del producto, tales como:
 - Identificación de la sustancia activa o del preparado.
 - Composición o información sobre los componentes.
 - Identificación de peligros.
 - Primeros auxilios.
 - Medidas de lucha contra incendios.
 - Medidas a tomar en caso de vertimiento accidental.
 - Manipulación y almacenamiento.
 - Controles de exposición y protección personal.
 - Propiedades físicas y químicas.
 - Estabilidad y reactividad.
 - Información toxicológica: toxicidad aguda, sub-aguda, crónica.
 - Información ecológica: biodegradabilidad, efectos eco tóxico y biológico.
 - Forma de eliminación.
 - Forma de transporte.
 - Información reglamentaria: etiquetado, pictograma.
 - Identificación de la sociedad o empresa que lo produzca o lo distribuya.
 - Otras informaciones.
9. **Tiempo de acción.** Tiempo de exposición requerido para que el producto cumpla con el objetivo.
10. **Forma de aplicación.** Recomendaciones acerca del modo de empleo.

11. **Campo de aplicación.** Responde a las preguntas dónde y para qué se requiere emplear el producto.
12. **Aspectos económicos.** Relación costo-beneficio. El costo debe evaluarse en relación con la dilución, el rendimiento y la seguridad.¹²

Los sanitizantes cuentan con un menor espectro ya que no eliminan por completo el número de microorganismos, pueden eliminar hongos y solo algunos virus. Según el test de chambers, un buen desinfectante es aquel que, a la concentración recomendada, causa un 99.996% de muerte a una cantidad entre 7.5×10^7 y 1.3×10^8 células/ml en 30 segundos.¹³

- Las características de un desinfectante ideal son:¹⁴
 - Debe ser soluble en agua.
 - Amplio espectro de actividad.
 - Estable: tiempo prolongado de vida útil.
 - No debe reaccionar con materia orgánica o inactivarse en presencia de ella.
 - Escasa o nula toxicidad para el ser humano.
 - Acción rápida.
 - Capacidad de penetración.
 - Acción residual.
 - Compatible con todos los materiales.
 - Disponibilidad y buena relación costo-riesgo-beneficio.
 - No debe afectar al medio ambiente.

Una de las características de mayor importancia que se debe tomar en cuenta es la cantidad de bacterias que se encuentran en la superficie a sanitizar, aun en exceso el agente bactericida no destruye todos los microorganismos solo produce una disminución gradual en el número de células viables.¹⁵

2.2.3. Mecanismos de acción de los agentes desinfectantes

Los mecanismos de acción de los desinfectantes son complejos, esta acción puede ejercerse principalmente sobre una función comprometiéndose luego otra, algunas veces reversible y otras irreversibles. Dentro de los principales mecanismos de acción de los desinfectantes se encuentran: ¹⁶

2.2.3.1. Agentes que lesionan la membrana celular

La estructura e integridad de la membrana dependen de él orden y disposición de los lípidos y las proteínas que la componen, los solventes orgánicos y los detergentes alteran esta organización estructural, lo que interfiere sobre la función normal de la membrana. El efecto, es la liberación de pequeños metabolitos de la célula y la interferencia sobre el transporte activo y el metabolismo energético. ¹⁶

- **Tensoactivos:** Las sustancias que reducen la tensión superficial o interfásica. Estos compuestos poseen grupos que atraen agua (hidrófilos) y grupos que la repelen (hidrófobos). ¹⁶
 - **Compuestos de amonio cuaternario:** Desorganizan la estructura lipoproteica de la membrana celular. ¹⁶
 - **Agentes aniónicos:** Los jabones y los ácidos grasos se clasifican como detergentes aniónicos, estos se disocian para dar un ion con carga negativa y tienen mayor actividad a un pH ácido, son efectivos contra los microorganismos Gram positivos y relativamente ineficaces contra las especies Gram negativas debido a su membrana externa lipopolisacárida. ¹⁶
- **Compuestos fenólicos:** Provoca la pérdida del contenido celular e inactiva irreversiblemente las oxidasas y las deshidrogenasas de la membrana. ¹⁶

- **Cresoles:** Son fenoles alquílicos simples y algunos de ellos como, los ortocresoles, metacresoles y paracresoles son más activos que el fenol y en general se emplean como una mezcla (tricresol).¹⁶
- **Difenólicos:** El compuesto más importante es el derivado clorado, hexaclorofeno, que posee una acción antimicrobiana elevada contra microorganismos Gram positivos, en especial estafilococos y estreptococos.¹⁶
- **Alcoholes:** En este tipo de compuestos el mecanismo de acción depende de la concentración en la que se encuentre el agente, concentraciones de 50% en adelante disuelven membranas lipídicas, rompen la tensión superficial de la célula y comprometen íntegramente la membrana, el alcohol que entra en el protoplasma desnaturaliza las proteínas de coagulación es decir rompe la estructura terciaria por medio de sus enlaces disulfuro pero únicamente en soluciones de alcohol menores al 70% ya que las concentraciones más elevadas son menos potentes debido a que las proteínas no son fácilmente desnaturizables en ausencia de agua; la causa es que el agua es necesaria para coagular las proteínas. Los alcoholes alifáticos, en especial el etanol, debido a su acción bactericida y su capacidad para eliminar lípidos de las superficies cutáneas, se ha usado de forma amplia como desinfectantes de la piel, sin embargo, su acción como desinfectante para destruir esporas a temperaturas normales es muy limitada. Es activo contra microorganismos Gram positivos, Gram negativos y ácidosresistentes. La actividad bactericida del alcohol isopropílico es ligeramente superior a la del etanol y es menos volátil.¹⁶

2.2.3.2. Agentes que desnaturalizan proteínas

Cada proteína tiene una conformación específica necesaria para su funcionamiento adecuado. Los compuestos que alteran la conformación de las proteínas por desnaturalización provocan un desplazamiento en esta conformación de manera que las cadenas se presentan arrolladas o enrolladas al azar y de forma irregular.¹⁷

- **Ácidos y álcalis:** Este tipo de compuestos ejercen su actividad antibacteriana a través de sus iones H⁺ y OH⁻ libres, por medio de las moléculas no disociadas o por alteración del pH del medio en que se encuentra el microorganismo. Los ácidos minerales fuertes y los álcalis fuertes, presentan propiedades desinfectantes dependiendo del grado de disociación en solución, sin embargo, algunos hidróxidos son más efectivos de lo que su grado de disociación podría indicar, lo que sugiere que el catión metálico también ejerce una acción tóxica directamente sobre el microorganismo.¹¹

2.2.3.3. Agentes que modifican los grupos funcionales y ácidos nucleicos

Cada enzima contiene grupos funcionales específicos que se unen a un sustrato para comenzar los episodios catalíticos. Cuando uno o más de estos grupos funcionales es alterado o destruido se produce la inhibición de la actividad enzimática, algunos de los grupos funcionales importantes de la pared, la membrana o los ácidos nucleicos de la célula son susceptibles a la desactivación.¹⁶

- **Metales pesados:** Las sales solubles de mercurio, arsénico, plata y otros metales pesados afecta la actividad enzimática formando mercáptidos con los grupos sulfhídrido de los residuos de cisteína. La reacción inicial es reversible y si se proporcionan grupos -SH extraños en forma de glutatión o de tioglicolato de sodio la mayor parte de las células se recupera.¹⁶

- **Agentes oxidantes:** Estos compuestos inactivan las enzimas por conversión de los grupos funcionales -SH en la forma oxidada S-S. Los halógenos y el peróxido de hidrógeno son los grupos más útiles, y algunos de estos atacan grupos amino, grupos indol y el grupo hidroxifenólico de la tirosina.¹⁶
 - **Cloro:** La actividad del cloro es casi exclusivamente bactericida y es efectivo contra gran cantidad de microorganismos incluyendo a los que esporulan. Además del cloro, existen tres tipos de compuestos clorados: los hipocloritos y las cloraminas orgánicas e inorgánicas, la acción desinfectante de todos los compuestos clorados se debe a la liberación de cloro libre, cuando se agrega cloro o hipocloritos al agua, el cloro reacciona con el agua para formar ácido hipocloroso, el cual en solución neutra o ácida es un agente oxidante fuerte y un desinfectante efectivo, la disociación del ácido hipocloroso depende del pH, que es el que determina la eficiencia de la desinfección. Es preciso mantener una concentración de 1000 ppm de cloro libre residual para asegurar una destrucción rápida. (30 segundos).¹⁶
 - **Yodo:** Al igual que el cloro tiene actividad bactericida contra microorganismos que esporulan y su nivel de desinfección depende del pH, a valores de pH inferiores a 6, es donde se manifiesta la acción bactericida máxima, el índice germicida disminuye a medida que el pH se incrementa por encima de 7.5, el ión yoduro, formado como resultado de la hidrólisis del yodo en soluciones acuosas, no tiene un efecto bactericida significativo. El uso principal del yodo es para la desinfección de la piel.¹⁶

- **Peróxido de hidrógeno:** La acción de este agente depende de su concentración, en una solución al 3%, el peróxido de hidrógeno es un antiséptico inocuo pero muy débil cuyo uso principal es en la limpieza de heridas. En general la acción antibacteriana del peróxido de hidrogeno se atribuye a su capacidad oxidante pero es probable que la formación del radical oxhidrilo del peróxido en la reacción dependiente de hierro sea el verdadero responsable de la mayor parte de esta actividad. Como desinfectante de materiales inertes el peróxido de hidrógeno es un agente muy útil y efectivo.¹⁶

- **Colorantes:** Algunos de los colorantes no sólo tiñen a las bacterias sino que además son inhibidores a diferentes diluciones. Los trifenilmetanos y las acridinas son algunos de estos compuestos.¹⁰
 - **Colorantes trifenilmetano:** Algunos de los compuestos derivados del trifenilmetano, en especial el verde brillante, el verde de malaquita y el cristal violeta, han tenido muchas aplicaciones más que solo el teñir microorganismos. La actividad de los colorantes trifenilmetanos es una propiedad de la seudóbasa formada por la ionización del colorante, la seudóbasa es más liposoluble que el catión y es probable que sea ésta la forma en que gana el acceso al interior de la célula.¹⁰
 - **Colorantes de acridina:** Llamados también "flavinas" debido a su color amarillo, interfieren en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas en las células bacterianas. Son moléculas heterocíclicas planas que interactúan con el DNA bicatenario helicoidal por intercalación, debido a su estructura hidrófoba plana, la acridina se inserta en el DNA entre dos bases sucesivas, separándolas de forma física.¹⁰

- **Agentes alquilantes:** El efecto desinfectante del formaldehído, el óxido de etileno y el glutaraldehído son resultado de su acción alquilante sobre las proteínas, la inhibición producida por estos agentes es irreversible, como consecuencia de una modificación de las enzimas y la inhibición de la actividad enzimática.¹⁶
 - **Formaldehído:** Alquila grupos carboxilo, oxhidrilo o sulfhidrilo por reemplazo directo de un átomo de hidrógeno por un grupo hidroximetilo. Se obtiene comercialmente en solución acuosa con 37% de formaldehído (formalina); o como paraformaldehído, un polímero sólido que contiene 91 a 99% de formaldehído. Las concentraciones empleadas para este propósito van del 0.2 al 0.4%.de formalina.¹⁶
 - **Glutaraldehído:** Este agente es 10 veces más efectivo que el formaldehído como agente bactericida y esporicida y es considerablemente menos tóxico, el mecanismo de acción se ha atribuido a su unión a grupos sulfhídrico o amino, pero su blanco específico en la célula no se ha definido y su eficacia no disminuye a causa de la presencia de materia que contenga proteínas.¹⁶
 - **Óxido de etileno:** Su actividad es contra todos los tipos de bacterias, incluidas las esporas y los bacilos tuberculosos. La acción alquilante es responsable de su actividad bactericida, el anillo óxido de etileno se abre en presencia de un hidrógeno lábil y forma un radical hidroxietilo ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), el cual entonces se une a la proteína en la posición ocupada anteriormente por el hidrógeno. Uno de sus usos más comunes reside en la esterilización.¹⁶

Cuadro 2. Mecanismo de acción de los desinfectantes.¹⁸

DESINFECTANTE	MECANISMO DE ACCIÓN	ESPECTRO DE ACCIÓN
ALCOHOLES	Los alcoholes actúan destruyendo la membrana celular y desnaturalizando las proteínas.	Los alcoholes poseen una rápida acción y amplio espectro de actividad, actuando sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas, incluyendo micobacterias, hongos y virus pero no son esporicidas.
ALDEHÍDOS FORMALDEHÍ DO	Alquilación de proteínas y ac. nucleicos	Los aldehídos tienen un amplio espectro de actividad contra microorganismos y virus. El formaldehído es bactericida, esporicida y virucida, pero trabaja más lentamente que el glutaraldehído. ¹⁹
HALOGENADOS HIPOCLORITOS	Son compuestos que tienen una capacidad como agentes fuertemente oxidantes, para atacar y destruir sustancias inorgánicas.	Los hipocloritos tienen un extenso espectro de actividad, son bactericidas, virucidas, fungicidas y esporicidas, pero actividad variable frente a micobacterias, según la concentración en que se use.
YODOFOROS	Tienen amplio espectro de actividad contra bacterias y hongos y presentan el mismo mecanismo de acción y espectro de actividad de los yodados. El más conocido de los yodóforos es la yodopovidona compuesta de yodo y polivinil-pirrolidona.	La yodopovidona es activa contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos, virus y micobacterias. Es efectiva contra el <i>S. aureus</i> y especies de <i>Enterococcus</i> .
FENOLES	Son bactericidas a bajas concentraciones, causando daño a las membranas con pérdida de los constituyentes citoplasmáticos, inactivando irreversiblemente las oxidasas y deshidrogenasas de membrana y produciendo desnaturalización de proteínas.	Los fenoles se utilizan más como desinfectantes, tienen propiedades antibacterianas frente a estreptococos, <i>Staphylococcus</i> y <i>Escherichia coli</i> , y también propiedades antifúngicas y antivirales.
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	El peróxido de hidrógeno tiene efectos oxidantes por producir OH y radicales libres, los cuales matan a los componentes esenciales de los microorganismos como lípidos, proteínas y ADN.	Es activo frente a bacterias y virus, según la concentración y condiciones de utilización. Estudios in vitro de soluciones de peróxido de hidrógeno al 3% han mostrado amplio espectro de eficacia, con mayor actividad frente a bacterias Gram positivas.

COMPUESTOS DE AMONIO	Son sustancias que lesionan la membrana celular debido a que desorganizan la disposición de las proteínas y fosfolípidos, por lo que se liberan metabolitos desde la célula, interfiriendo con el metabolismo energético y el transporte activo.	Activos para eliminar bacterias Gram positivas y Gram negativas, aunque éstas últimas en menor grado. Son bactericidas, fungicidas y virucidas, actuando sobre virus lipofílicos pero no sobre los hidrófilos. No tiene acción sobre las micobacterias, ni son esporicidas. ²⁰
CUATERNARIOS (agentes activos catiónicos)		

2.2.4. Niveles de desinfección

Se han definido tres diferentes niveles de desinfección para clasificar a los diferentes tipos de agentes químicos existentes: alta, intermedia y baja según la intensidad de su actividad sobre bacterias, hongos, virus (lipídicos y no lipídicos) y esporas (Cuadro 3).²¹

Cuadro 3. Nivel de los desinfectantes.^{21, 22}

NIVEL	FUNCIÓN DEL AGENTE QUÍMICO
DAN	Esterilizante Elimina a todos los microorganismos incluyendo los virus resistentes y esporas bacterianas.
DNI	Elimina bacterias vegetativas, micobacterias, hongos, virus con envoltura y algunos virus con envoltura.
DBN	Sanitizante Elimina bacterias vegetativas, hongos y algunos virus con envoltura y sin envoltura

DAN: Desinfectante de alto nivel

DNI: Desinfectante de nivel intermedio

DBN: Desinfectante de bajo nivel

2.2.5. Factores que afectan la efectividad del proceso de desinfección.

- *Cantidad y ubicación de los microorganismos.* Cuanto mayor es la biocarga, mayor es el tiempo que un desinfectante necesita para actuar, por ello, es fundamental realizar una escrupulosa limpieza de las superficies.
- *Resistencia de los microorganismos al agente químico.* Se refiere principalmente al espectro de acción que tiene el método o agente utilizado.
- *Concentración de los agentes.* Se relaciona con la potencia de cada uno de los agentes para que produzcan la acción desinfectante, las concentraciones varían con respecto a los agentes desinfectantes y en algunos casos pueden relacionarse con un efecto deletéreo sobre el material.
- *Factores físicos y químicos.* Algunos desinfectantes tienen especificadas la temperatura ambiente a la que deben ser utilizados para su efectividad y el pH puede favorecer la actividad de los desinfectantes.
- *Materia orgánica.* La presencia de materias orgánicas como suero sangre y pus, materia fecal u otras sustancias orgánicas pueden inactivar la acción de algunos desinfectantes comprometiendo su efectividad.²¹

2.3. Hipoclorito de sodio

2.3.1. Identidad de la sustancia química.²⁴

Fórmula: NaOCl

Estructura Molecular: Na-O-Cl

CAS: 7681-52-9

Número UN: 1791

Clase de Riesgo Primario UN: 8

2.3.2. Descripción

Sólido cristalino blanco de olor fuerte muy inestable, comúnmente encontrado en soluciones acuosas como líquido incoloro con olor fuerte.

El hipoclorito de sodio se puede preparar en forma anhidro, con una pureza superior al 90%, pero se descompone con facilidad al cabo de pocos días, en ocasiones con fuerza explosiva, también forma un monohidrato que es difícil de obtener puro. Otro de sus hidratos tiene fórmula molecular $\text{NaOCl} \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, y se trata de un compuesto cristalino tetragonal, que tiene poca estabilidad para su uso comercial. El hipoclorito de sodio pentahidratado, $\text{NaOCl} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, tiene un punto de fusión de 27°C , por lo cual se debe mantener refrigerado para que conserve su estado sólido.²⁴

Debido a la inestabilidad del hipoclorito de sodio sólido, se encuentra más comúnmente en solución acuosa. Las concentraciones de hipoclorito de sodio encontradas en el comercio se pueden clasificar en dos grandes grupos: soluciones acuosas con concentración de cloro activo inferior al 10%, y soluciones acuosas con concentración de cloro activo superior al 10%. Las soluciones acuosas de hipoclorito de sodio poseen un ligero color amarillo, y un olor característico a cloro.²⁵

2.3.3. Propiedades fisicoquímicas

- Densidad 1110kg/m³; 1.11 g/cm³
- Punto de fusión 291 K (18° C)
- Punto de ebullición 374 K (101° C)
- Acidez 7 pK_a
- Incompatible con ácidos fuertes, aminas y amoniaco
- Reacciona violentamente con sales de amonio, metanol, aziridina y feniloacetnitrilo
- Solubilidad en agua: 29.3 g/100mL, 273 K (0° C) ²⁴

2.3.4. Propiedades Químicas.

En general, los hipocloritos son agentes oxidantes fuertes, con mayor fuerza que el peróxido de hidrógeno o el dióxido de cloro. Su carácter de oxidante fuerte le permite actuar como agente de blanqueo y desinfección; estas propiedades se aprovechan para el tratamiento de fibras y la eliminación de microorganismos en el agua.

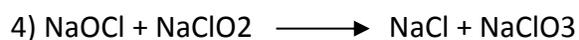
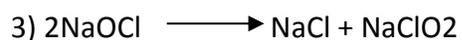
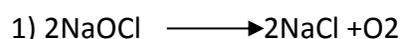
Las soluciones de hipoclorito de sodio caen dentro de dos clasificaciones: blanqueadores de uso doméstico, que contienen entre 5 y 5.5% de cloro disponible, y soluciones fuertes o comerciales, que contienen entre 12 y 15% de cloro disponible. El término “contenido de cloro disponible”, también denominado cloro activo y compara el poder oxidante del agente con aquel de la cantidad equivalente de cloro elemental empleado para hacer la solución.

Las soluciones de hipoclorito de sodio se descomponen en dos maneras a cloruro de sodio (NaCl) y oxígeno (O₂) (reacción 1), o por descomposición a cloruro de sodio y clorato de sodio (NaClO₃) (reacción 2):

La última de estas dos reacciones ocurre en dos pasos: un paso lento inicial en que se forma el clorito de sodio (NaClO_2) (reacción 3), y un paso rápido de descomposición entre el hipoclorito y el clorito (reacción 4):

El hipoclorito de sodio puede reaccionar también con ácido hipocloroso (reacción 5), esta última ecuación se emplea con frecuencia para enfatizar el hecho de que en medio ácido, el hipoclorito se descompone con mayor facilidad que en medio básico, razón por la cual las soluciones de hipoclorito de sodio se mantienen a pH 11.

En las soluciones de hipoclorito de sodio se da un balance dinámico, que se representa por la siguiente ecuación (reacción 6):



De acuerdo con un estudio acerca del mecanismo de acción del hipoclorito de sodio sobre microorganismos, éste actúa como un solvente de materia orgánica, específicamente de ácidos grasos, a quienes transforma en sales de ácidos grasos (jabones) y glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$), reduciendo la tensión superficial de la solución remanente. Además, el hipoclorito de sodio neutraliza los aminoácidos, formando agua y sales. Con la disminución de iones Hidroxilo (OH^-) mediante la formación de agua, se reduce el pH, estimulando la presencia de ácido hipocloroso que en contacto con componentes orgánicos actúa como solvente, libera Cloro que se combina con el grupo amino de las proteínas, formando cloroaminas. El ácido hipocloroso y los iones hipoclorito (OCl^-) llevan a la degradación e hidrólisis de aminoácidos.²⁵

Cuadro 4. *Propiedades físicas para el hipoclorito de sodio.*²⁵

PROPIEDAD	VALOR
Peso Molecular (g/mol)	74.4
Estado Físico	Líquido
Punto de Ebullición (° C) (760 mmHg)	120 (Concentración cloro activo: 6.5%) 40 (5% de NaOCl en agua)
Punto de Fusión (° C)	8,6 (Concentración cloro activo: 6.5%) 6 (5% de NaOCl en agua)
Presión de Vapor (mmHg)	17.5 a 20° C (5% de NaOCl en agua)
Gravedad Específica (Agua = 1)	1.11 – 1.2 a 25° C, agua 4° C (Concentración cloro activo: 6.5%) 1.07 – 1.14° C (5% de NaOCl en agua)
Densidad del Vapor (Aire = 1)	No Reportado
Velocidad de Evaporación (Acetato de Butilo = 1)	No Reportado
Solubilidad en Agua	Soluble en agua fría, se descompone en agua caliente (Concentración cloro activo: 6.5%) 100% en agua (5% de NaOCl en agua)
Límites de Inflamabilidad (% vol)	No combustible
Temperatura de Auto ignición (° C)	No reportado
Punto de Inflamación (° C)	No reportado
pH	12 (Concentración cloro activo: 6.5%) 9-105% de NaOCl en agua)

2.3.5. Incompatibilidades

En el cuadro 5, se listan las sustancias que son incompatibles con el hipoclorito de sodio, junto con las posibles consecuencias de la mezcla accidental del hipoclorito con tales compuestos.²⁶

Cuadro 5. Lista de las sustancias que son incompatibles con el hipoclorito de sodio, junto con las posibles consecuencias de la mezcla accidental del hipoclorito con tales compuestos.²⁶

MATERIAL INCOMPATIBLE	REACCION
Ácidos, compuestos ácidos y limpiadores basados en ácidos.	
Compuestos tales como:	
Sulfato de aluminio - Ácido clorhídrico	
Cloruro de aluminio - Ácido sulfúrico	
Cloruro férrico - Ácido fluorhídrico	Liberación de cloro que puede ocurrir con violencia.
Cloruro ferroso - Ácido fluorosilícico	
Sulfato férrico - Ácido fosfórico	
Sulfato ferroso - Concreto	
Soluciones cloradas - Limpiadores de Sulfato ferroso	
Reactivos y productos de limpieza que contengan amoniaco, tales como:	
Hidróxido de amonio - Sulfato de amonio	Formación de compuestos explosivos.
Cloruro de amonio - Sales de amonio	Liberación de cloro u otros gases nocivos.
Silicofluoruro de amonio	

Compuestos orgánicos y otros compuestos

tales como:

Formación de compuestos orgánicos clorados.

Solventes y limpiadores - Propano

Formación de compuestos explosivos.

Basados en solventes - Polímeros orgánicos

Liberación de cloro, que puede ocurrir en forma violenta.

Combustibles y aceites - Etilenglicol

Combustibles - Insecticidas

Aminas – Metanol

Metales tales como:

Cobre - Cobalto

Liberación de Oxígeno, que generalmente no ocurre con violencia. Puede producir sobrepresión o ruptura de sistemas cerrados

Níquel (Ni) - Hierro

Evitar el transporte o almacenamiento en recipientes o equipos fabricados en acero inoxidable, aluminio, acero al carbono u otros metales comunes.

Peróxido de hidrógeno

Puede ocurrir generación violenta de oxígeno.

Agentes Reductores tales como:

Sulfito de sodio - Hidrosulfito de sodio.

Liberación de calor, puede producir ebullición o salpicaduras.

Bisulfito de sodio - Tiosulfato de sodio.

2.3.6. Actividad microbicida y diluciones recomendadas para su uso

La organización mundial de la salud (OMS) recomienda como solución desinfectante al hipoclorito de sodio, en general, para toda clase de trabajos de laboratorio, a una concentración de 1 g/L (1000 ppm) de cloro libre, en caso de trabajos que conlleven un peligro biológico y/o en presencia de grandes

cantidades de materia orgánica, se recomienda utilizar una solución más concentrada, que contenga 5 g/L (5000 ppm) de cloro libre. Las soluciones de hipoclorito sódico, como la lejía de uso doméstico, contienen 50 g/L (50 000 ppm) de cloro libre y por tanto deben diluirse a razón de 1: 50 o 1: 10 para obtener concentraciones finales de 1 g/L y 5 g/L, respectivamente. Las soluciones industriales de lejía tienen una concentración de hipoclorito sódico cercana a los 120 g/L (120 000 ppm) y deben diluirse en consecuencia para obtener los niveles indicados. Los gránulos o comprimidos de hipoclorito cálcico (Ca (ClO)₂) suelen contener alrededor de un 70% de cloro libre. Las soluciones preparadas con gránulos o comprimidos, que contienen 1.4 g/L y 7.0 g/L, contendrán entonces 1.0 g/L y 5 g/L de cloro libre, respectivamente. La lejía no se recomienda como antiséptico, pero puede utilizarse como desinfectante de uso general y para sumergir materiales no metálicos contaminados. En caso de emergencia, también puede utilizarse la lejía para desinfectar agua para beber con una concentración final de 1–2 mg/L de cloro libre.⁹

Cuadro 6. Diluciones recomendadas de compuestos que liberan cloro.⁹

AGENTE QUÍMICO	SITUACIONES LIMPIAS*	SITUACIONES SUCIAS**
Cloro libre requerido	0.1% (1 g/L)	0.5% (5 g/L)
Solución de hipoclorito sódico (5% de cloro libre)	20 mL/L	100 mL/L
Hipoclorito cálcico (70% de cloro libre)	1.4 g/L	7.0 g/L

*Superficies libres de polvo y/o materia orgánica. ** Superficies no libres de polvo y/o materia orgánica.

2.3.7. Precauciones²

- Tóxico por ingestión.
- Corrosivo para los metales.
- Vapores sumamente tóxicos, se debe almacenar y utilizar solo en zonas ventiladas.
- No mezclarse con ácidos para evitar la liberación rápida de cloro gaseoso.

2.4. Valoración de Hipoclorito de sodio

La titulación yodométrica (TY) se desarrolló para conocer la concentración de hipoclorito de sodio a nivel doméstico.²⁷

A un matraz con agua destilada se adicionan: yoduro de potasio grado reactivo, ácido acético glacial y solución de hipoclorito de sodio a titular. El cloro disponible oxida los iones de yoduro para producir yodo, el cual torna la solución de color café. La solución resultante se titula con una solución estándar de tiosulfato de sodio grado reactivo a una concentración de 0.1N hasta que el color café de la solución vira a un amarillo paja, en ese momento se agrega como indicador almidón líquido para indicar el punto final de la reacción.

La concentración de hipoclorito es dada por la siguiente ecuación:

$$(3.722 \cdot A \cdot N) / V$$

Donde:

A= equivale a mL de la solución valorada de tiosulfato de sodio requeridos para la titulación de la muestra

N= equivale a la Normalidad de la solución valorada de tiosulfato de sodio

V= equivale al volumen tomado de la muestra en mL; 3.722 al valor equivalente en peso del hipoclorito conforme a 1 mL de solución tiosulfato de sodio a 0.1N.^{27, 28}

2.5. Microorganismos comunes en superficies

Uno de los hábitats microbianos más comunes y de una importancia considerable debido a la fácil adsorción de nutrientes provenientes del medio ambiente, son las superficies ya que en estos microambientes las concentraciones de nutrientes pueden ser superiores a las de otros medios con agua.²⁹

En las superficies se puede encontrar una gran variedad de microorganismos que van de los no patógenos o potencialmente patógenos a los patógenos dependiendo del ambiente en cuestión, sin embargo los que se presentan con regularidad son *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Bacillus cereus*, además de algunos hongos como *Trichophyton mentagrophytes*.^{29, 30}

2.5.1. Microorganismos control

La industria farmacéutica utiliza diferentes tipos de desinfectantes dentro de sus instalaciones, los cuales es necesario evaluar para determinar su eficacia, realizando pruebas con microorganismos de la ATCC o American Type Culture Collection, así como aislamientos ambientales. El objetivo es seleccionar un grupo de organismos que representan todo el espectro del reino *Monera* y *Fungi*.¹⁰

1. Coco Gram positivos
2. Bacilo Gram negativos, forma esporas
3. Bacilos Gram negativos (uno fermentador y uno no fermentador)
4. Levadura
5. Hongo

Los organismos usualmente utilizados en la evaluación de desinfectantes por las industrias farmacéuticas según la NMX-BB-040-SCFI-1999, son las siguientes:

- *Staphylococcus aureus* ATC 11229
- *Escherichia coli* ATCC 6538

3. NMX-BB-040-SCFI-1999. MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PRODUCTOS GERMICIDAS.²³

3.1. Objetivo de la NMX

Esta norma mexicana establece el método de prueba para determinar la actividad antimicrobiana.

3.2. Campo de aplicación de la NMX

Esta norma mexicana es aplicable a los productos germicidas, siempre y cuando la norma específica del producto así lo indique.

3.3. Fundamento

Para la determinación de la actividad antimicrobiana, se establece un método que consiste en determinar el porcentaje de reducción de un número determinado de microorganismos cuando se ponen en contacto con un germicida, bajo condiciones de prueba específicas. Este método se basa en una modificación de la técnica recuento en placa y dilución en tubo para la evaluación del sanitizante.

3.4. Microorganismos a prueba.

- *Escherichia coli* ATC 11229
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

3.4.1. *Escherichia coli*

Es la especie de las *Enterobacteriace* que se encuentra en la biota autóctona con más frecuencia, es una bacteria anaeróbica facultativa y colonizadora del colón humano. Se establece en el intestino delgado y grueso, forma parte de la biota intestinal y tienen efectos inhibitorios sobre otras cepas patógenas por lo que la colonización del intestino es benéfica para el hospedero.³¹

3.4.1.1. Morfología.

Bacilo Gram negativo, pequeño, oblongo, fino; con dimensiones de 0.5 X 1.0 a 3.0 micras y se mueve por medio de flagelos peritricos, con una sola cadena espiral de ADN, móvil, aerobio y anaerobio facultativo, posee apéndices filamentosos de naturaleza protéica, frecuentemente portadoras de adhesinas, que presentan la propiedad de combinarse con receptores de naturaleza polisacárida localizados en la superficie de las células epiteliales llamados pillis o fimbrias, muchas cepas producen una pequeña microcápsula, muy pocas elaboran macrocápsulas y no fabrican esporas; en las pruebas bioquímicas es positiva al indol, decarboxilasa de lisina, fermentación de manitol y gas a partir de la glucosa; además es lactosa positiva en el 90% de las cepas con citrato negativo.³²

3.4.1.2. Cultivo.

E.coli se aísla, con facilidad en medios habituales, casi bajo cualquier condición, en medios indicadores, como agar Mac Konkey, fermenta lactosa con rapidez y produce colonias ácidas de color rosa.

Forma colonias circulares y lisas en medios sólidos, con bordes bien definidos y en algunos medios como EMB presenta brillo metálico característico, ciertas cepas al crecer en un medio de gelosa sangre producen una pseudo α o β hemólisis.³²

3.4.1.3. Patogénesis.

Se ha demostrado que los traumatismos relativamente menores, así como el efecto mecánico del contacto sexual, brinda acceso vesical a las bacterias en la mayoría de los casos estas bacterias se elimina con la acción de arrastre de la micción. Los factores que violan la integridad vesical (Sondas urinarias) o que obstruyen el flujo de orina (próstata) se acompaña también de infección. Son menos de 10 serotipos que producen la mayoría de las infecciones en las vías urinarias (IVU), y estos serotipos no son dominantes en la flora fecal.

La capacidad de *E. coli* de producir IUV se relaciona con factores generales de virulencia, como hemolisina alfa en conjunto con la adherencia de las células mediadas por pilli.²²

Dentro de la especie se encuentran cepas patógenas que causan distintos síndromes diarreicos en la que el intestino no trabaja en forma normal, absorbe menos agua y sales hacia la sangre, elimina más agua y sales desde la sangre hacia el intestino, es por esto que se pierden en las heces más agua y sales de lo normal resultando en deshidratación, causada también por vómitos, que con frecuencia acompañan a la diarrea y sucede más rápidamente en infantes (menores de un año) y niños pequeños.³³

3.4.2. *Staphylococcus aureus*

Los seres humanos son portadores de gran número de estafilococos y de microorganismos afines, en la nariz y la piel. *Staphylococcus aureus* es uno de ellos y es un miembro temporal o transitorio de la biota microbiana. Estos cocos Gram positivos, miembros de la familia *Micrococcaceae*, en ciertas circunstancias producen infecciones graves y puede matar a su huésped, es la causa más común de infecciones de las heridas quirúrgicas y traumáticas y de las infecciones superficiales de la piel.³⁴

3.4.2.1. Morfología.

Los *Staphylococcus* son bacterias esféricas de aproximadamente 1 µm de diámetro dispuestas en racimos irregulares.

También se observan cocos individuales, pares, tétradas, cadenas en medios de cultivo líquidos. Los cocos jóvenes son intensamente Gram positivos; al envejecer muchas células se vuelven Gram negativas. Los *Staphylococcus* no son móviles y no forman esporas: Bajo la influencia de fármacos como la penicilina los *Staphylococcus* experimentan lisis.³⁵

La pared celular de *S. aureus* está constituida por peptidoglucano Gram positivo típico intercalado con moléculas de ácido ribitol- teicóico, que es antigénico y

relativamente específico para *S. aureus*. En la mayor parte de las cepas el peptidoglucano está recubierto por proteínas de superficie.²²

3.4.2.2. Cultivo.

Crecen rápidamente en casi todos los medios bacteriológicos bajo condiciones aerobias o microaerofílicas. Se desarrollan con rapidez a una temperatura de 37° C. Las colonias en medios sólidos son redondas lisas elevadas y brillantes. *Staphylococcus aureus* suele formar colonias de color gris a amarillo dorado profundo, *S. aureus* produce diversos grados de hemólisis.³⁵

3.4.2.3. Patogénesis.

Las etapas iniciales para la colonización por *S. aureus* son mediadas por diversas proteínas de superficie que se fijan a elementos del huésped, telas, líquidos corporales o cuerpos extraños como sondas y catéteres.³⁶

S. aureus tiene poca capacidad de infección, a menos que existan factores como traumatismo, materiales extraños u otras condiciones locales. Desde el punto de vista experimental, se requiere la inyección intradérmica de hasta 10⁶ microorganismos para iniciar una lesión local a menos que se utilice material de sutura o polvo de talco infectado con las bacterias.²²

4. Uso del Hipoclorito de sodio en los laboratorios de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

En los laboratorios y campos clínicos de la FES ZARAGOZA, se involucra la observación, el manejo y estudio de diversos microorganismos de importancia médica, como son: las bacterias, parásitos, hongos y virus, que con más frecuencia se presentan en nuestro país.³⁷

Las superficies deben ser consideradas como uno de los reservorios potenciales más importantes que albergan microorganismos tanto patógenos como no patógenos. En el ámbito educativo en la carrera de Química Farmacéutico Biológica (QFB), que se imparte en la FES Zaragoza, donde se cuenta con laboratorios experimentales de Microbiología General e Inmunología, para las prácticas de los alumnos con microorganismos, es necesario el manejo adecuado de la limpieza y sanitización en las áreas de trabajo para mantener el control de dichos microorganismos.²

El hipoclorito de sodio es el sanitizante mayormente utilizado en la desinfección de superficies en los laboratorios de Microbiología e Inmunología, pero no el único, por lo que en un estudio realizado en la FES Zaragoza a diferentes sanitizantes, como el Cloruro de benzalconio y el etanol 70%, se encontró que:

El hipoclorito de sodio es el que tiene mayor efectividad tanto en tiempo de contacto y en número de biocarga eliminada, por tanto es el sanitizante idóneo para la limpieza de los laboratorios por el costo/beneficio.²

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La limpieza es el proceso mediante el cual se logra la eliminación de la suciedad en las superficies aplicadas, que significa a la vez la eliminación de la fracción principal de microorganismos presentes en las superficies. Por otro lado la desinfección es la destrucción de microorganismos infecciosos remanentes en objetos inanimados o la reducción de los mismos a niveles que no constituyan un peligro para la salud pública. Existen diferentes tipos de productos químicos que eliminan la carga bacteriana y que tienen diferentes mecanismos de acción para lograrlo.³⁷

En un estudio realizado recientemente en la FES Zaragoza se comprobó la eficacia de tres diferentes tipos de desinfectantes (Cloruro de benzalconio, Etanol e Hipoclorito de sodio), que son utilizados frecuentemente como sanitizantes en los laboratorios de investigación de la UMIEZ así como en las áreas de producción de la FES Zaragoza, dicho estudio reto la actividad de estos desinfectantes con base en la Norma Mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999, con lo cual se concluyó que el hipoclorito de sodio es él que tiene mayor efectividad tanto por tiempo de contacto como por número de biocarga eliminada, por tanto es el sanitizante idóneo para la limpieza de los laboratorios por el costo/beneficio.²

En México se comercializan diferentes marcas de hipoclorito de sodio, como Clorox®, Cloralex®, Los patitos® y Great Value® entre otras; la procuraduría federal del consumidor (PROFECO) indica a Clorox® como marca líder en desinfección. En la literatura no hay estudios que determinen la eficacia de estos productos como sanitizante, por lo que en este proyecto se evaluarán siguiendo el procedimiento establecido en la Norma Mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999 para determinar su capacidad antimicrobiana con respecto a la eficacia de la marca líder y así poder utilizar indistintamente una de estas marcas con la certeza de que el área donde se utilice estos productos realmente ha sido sanitizada.

6. OBJETIVOS.

6.1. General.

Evaluar la actividad antimicrobiana de tres diferentes marcas comerciales de sanitizantes a base de hipoclorito de sodio, para compararlos con la actividad antimicrobiana de la marca líder de hipoclorito de sodio en México, de acuerdo a la norma NMX-BB-040-SCFI-1999, para determinar si este puede ser sustituido por cualquiera de estas otras marcas con base a su eficacia y costo.

6.2. Particulares.

- Evaluar con base al método para la determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas descrito en la norma NMX-BB-040-SCFI-1999. la eficacia de cada uno de los sanitizantes elegidos y compararlos entre sí para determinar cuál de estos es más eficaz.
- Analizar los resultados obtenidos del método para la determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas descritos en la norma NMX-BB-040-SCFI-1999. para determinar si el sanitizante de la marca líder es el más eficaz o si este puede ser sustituido por alguno de las marcas analizadas con base en su costo.

7. HIPÓTESIS.

- Se espera que la marca líder de sanitizante a base de hipoclorito de sodio sea más eficiente con respecto a las otras marcas comerciales seleccionadas, evaluando la actividad antimicrobiana de cada una de estas con base a la Norma Mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999.

8. MATERIAL Y MÉTODOS.

8.1. Tipo de estudio.

- Experimental, Prolectivo (prospectivo) y Transversal.

Población estudio:

- Sanitizantes:
 - Hipoclorito de sodio marca líder en el mercado (Clorox[®] concentrado)
 - Hipoclorito de sodio (Cloralex[®])
 - Hipoclorito de sodio (Los patitos[®])
 - Hipoclorito de sodio (Great Value[®])

8.2. Criterios.

8.2.1. Inclusión

- Hipoclorito de sodio de la Marca líder y las marcas establecidas en la población de estudio.
- Sin señales de partículas extrañas.

8.2.2. Exclusión

- Hipoclorito de sodio otras marcas no establecidas en la población de estudio.
- Sanitizantes con un tiempo prolongado de antigüedad.
- Deja residuos en las superficies aplicadas.
- Sanitizantes con partículas extrañas.

8.3. Variables

8.3.1. Dependientes:

- Carga microbiana

8.3.2. Independientes:

- Marca de Sanitizante

8.4. Material y Equipo

Cuadro 7.1 Características y especificaciones del material utilizado en la prueba.

MATERIAL	ESPECIFICACIÓN
Agitador de vidrio	s/e
Cajas de Petri	Pyrex
Matraz Erlenmeyer	250 mL – Pyrex
Matraz volumétrico	250 mL – Pyrex
Mechero Fischer	AESA
Pipeta automática	100 µL– Labnet
Pipeta automática	100 –1000 µL – Labnet
Pipeta graduada	10 mL – Pyrex
Probeta	100 mL – Pyrex
Termómetro Brannan	-10 a 250° C
Vasos de precipitados	50, 100 mL– Pyrex
Tubos de ensayo con tapa de rosca.	20 mm X 150 mm – Pyrex
Pipetas graduadas	10 mL – Pyrex
Tripie	AESA

s/e: sin especificación.

Cuadro 7.2 Características y especificaciones del equipo utilizado en la prueba.

EQUIPO	ESPECIFICACIÓN
Autoclave	Steele
Balanza analítica	Ohaus Explorer plus
Espectrofotómetro	(20+) ThermoScientific
Incubadora	ShelLab
Vortex	Scientific Industries Ing SA

8.5. Medios y Reactivos

Cuadro 8.1 Características y especificaciones de los medio utilizados en la prueba.

MEDIOS	ESPECIFICACIÓN
Agar para métodos estándar	Becton Dickinson
Agar Soya tripticaseína	Bioxon
Caldo soya tripticaseína	Bioxon

Cuadro 8.2 Características y especificaciones de los reactivos utilizados en la prueba.

REACTIVOS	ESPECIFICACIÓN
Ácido clorhídrico	EM Science
Ácido sulfúrico concentrado	Grado reactivo Reasol
Agua destilada	Theissier
Cloruro de bario	Baker analyzed
Fosfato monobásico de potasio	Baker analyzed
Hidróxido de sodio	Merck
Lecitina de soya	s/e
Polisorbato 80	s/e

s/e: sin especificación.

8.6. Material Biológico.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Escherichia coli* ATCC 11229

8.7. Métodos.

8.7.1. Preparación y acondicionamiento de la muestra

Conservación de los microorganismos de prueba:

“Conservar las cepas de microorganismos sembrándolos cada semana en tubos de 16 mm X 125 mm con 7 mL de agar nutritivo inclinado, incubar a una temperatura de 35 a 37° C de 20 a 24 hs y mantenerlos en refrigeración.”²³

8.7.2. Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba.

“Antes de realizar la prueba, efectuar dos siembras de cada uno de los microorganismos de prueba e incubar a temperatura de 35° C a 37° C de 20 a 24 hs. A partir de estos cultivos, efectuar cuatro siembras de los microorganismos de prueba, en tubos de 22 X 175 mm que contengan cada uno 10 mL de agar nutritivo inclinado e incubar de 20 a 24 hs a una temperatura de 35° C a 37° C.”²³

“Remover el crecimiento del primer tubo con 5 mL de solución salina, con esta misma suspensión remover el crecimiento del segundo tubo, y así consecutivamente hasta llegar al cuarto tubo, transferir el sobrenadante a un tubo de ensayo estéril y continuar diluyendo con solución salina, si es necesario, hasta obtener una suspensión con la misma opacidad del tubo 8 de la escala de Mc Farland, leer la suspensión a una longitud de onda de 580 nm, esta debe dar una lectura entre 3% y 5% de transmitancia, de no ser así diluir con solución salina.”²³

8.7.3. Determinación de la cuenta viable inicial.

1. “A un tubo de ensaye que contenga 9.9 mL de la solución amortiguadora de fosfatos diluida estéril, transferir 0.1 mL de la suspensión de los microorganismos de prueba y efectuar siete diluciones más, hasta llegar a la dilución decimal 10^{-14} . El número de diluciones puede variar dependiendo del microorganismo.”²³
2. “Colocar en cuatro tubos de ensaye de 22 X 175 mm, 15 mL de agar para métodos estándar a una temperatura de 45° C, agregar a cada tubo 1 mL de cada dilución, homogeneizar en un vórtex, vaciar a las placas y dejar solidificar invertir las cajas de Petri e incubar de 35 a 37° C durante 48 hs. Contar las colonias contenidas en cada una de las cajas, registrar el número de colonias formadas y elegir aquella dilución en la cual el número de colonias se encuentre entre 25 y 250 para la determinación de células sobrevivientes.”²³

8.7.4. Preparación de las diluciones de los sanitizantes a emplear.

El hipoclorito de sodio comercial está a una concentración aproximada a 5.25% (5250 ppm) Según un estudio realizado en la Universidad Nacional Autónoma de México a diferentes marcas de productos desinfectantes comercializadas en el mercado mexicano, entre estas, las marcas seleccionadas para este estudio.³⁸

Cuando se utilizan en presencia de sangre su concentración debe ser de 5.000 ppm, para lograr la inactivación. A 1.000 ppm tiene efecto contra hongos, protozoos, micobacterias y endosporas bacterianas. A 100 ppm destruye virus y formas vegetativas de bacterias.³⁹

Como solución desinfectante el hipoclorito de sodio en general para toda clase de trabajos de laboratorio se utilizará una concentración de 1 g/L (1000 ppm) de cloro libre En caso de derrame que conlleve un peligro biológico y en presencia de grandes cantidades de materia orgánica, se recomienda utilizar una solución más concentrada, que contenga 5 g/L (5000 ppm) de cloro libre. Las soluciones de hipoclorito sódico, como la lejía de uso doméstico, contienen 50 g/L (50 000 ppm) de cloro libre y por tanto deben diluirse a razón de 1:50 o 1:10 para obtener concentraciones finales de 1 g/L y 5 g/L, respectivamente. Las soluciones industriales de lejía tienen una concentración de hipoclorito sódico cercana a los 120 g/L (120 000 ppm) y deben diluirse en consecuencia para obtener los niveles indicados. Los gránulos o comprimidos de hipoclorito cálcico ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) suelen contener alrededor de un 70% de cloro libre. Las soluciones preparadas con gránulos o comprimidos, que contienen 1.4 g/L y 7.0 g/L, contendrán entonces 1.0 g/L y 5 g/L de cloro libre, respectivamente. La lejía no se recomienda como antiséptico, pero puede utilizarse como desinfectante de uso general y para sumergir materiales no metálicos contaminados. En caso de emergencia, también puede utilizarse la lejía para desinfectar agua para beber con una concentración final de 1–2 mg/L de cloro libre.⁹

8.7.5. Determinación de las células sobrevivientes

Inoculación de la muestra

1. “Para cada uno de los microorganismos de prueba, medir por duplicado 9.8 mL del desinfectante a una concentración de 1000 ppm, transferir a tubo de ensayo con tapa de rosca de 22 X 175 mm estériles.
2. Inocular en forma individual cada tubo con 0.2 mL de la suspensión de cada uno de los microorganismos de prueba, (de la dilución decimal elegida previamente en la determinación de cuenta viable inicial) en el centro, evitando tocar con la punta, las paredes.
3. Agitar el sanitizante con la muestra inoculada, en un vortex, exactamente 30 segundos después de la inoculación, transferir 1 mL de la misma, a un tubo de ensayo conteniendo 9 mL de la solución neutralizante diluida, homogenizar con un vortex y transferir por duplicado alícuotas de 1 mL a tubos de ensayo que contengan 15 mL de agar para métodos estándar a 45° C , homogenizar con vortex y vaciar a cajas de Petri estériles permitir que solidifique, invertir las placas e incubar de 35 a 37° C) durante 48 hs. Después del período de incubación contar el número de UFC en las placas.
4. Promediar los resultados de las placas de la cuenta viable inicial y de las células sobrevivientes y calcular el % de reducción mediante la siguiente fórmula.”²³

8.7.6. Porcentaje de reducción.²

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{S \times 100}{C.V}$$

Figura 2

Dónde:

S= células sobrevivientes UFC/mL

C.V= cuenta viable inicial (promedio).

Ejemplo:

$$\begin{aligned} & \text{Cuenta viable inicial: } 5.2 \times 10^9 \text{ UFC/mL} \\ & \text{Células sobrevivientes: } 2 \times 10^8 \\ & \% \text{ de reducción} = 100 - \frac{2 \times 10^8 \times 100}{5.2 \times 10^9} = 96.15\% \end{aligned}$$

Figura 2.1

9. RESULTADOS

9.1. Determinación de células sobrevivientes NMX-BB-040-SCFI-1999

9.1.1. Montaje de la técnica

Para la determinación de la prueba de cuenta viable inicial especificada en la Norma Mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999, se realizó el montaje de la técnica con el fin de homogenizar las condiciones y la forma de trabajo para evitar variaciones en los resultados que pudieran deberse a diferencias en el tratamiento de las muestras. Se eligió la cepa de *Escherichia coli* para el montaje de esta técnica con la que se evaluó la actividad antimicrobiana a partir de una suspensión que leída a 580 nm dio una lectura de 7% de transmitancia, donde a partir de esta suspensión se realizó por duplicado una serie de diluciones para obtener el número de colonias requerido por la norma, que se encuentra en un rango entre 25 y 250, en el cuadro 9.1 se encuentran las colonias en placa obtenidas a diferentes diluciones. En la dilución 10^{-6} se obtuvo un total de 739 colonias y 698 colonias para su duplicado; en la dilución 10^{-8} se obtuvo un total de 7 colonias y 8 colonias para su duplicado, aquellas que fueron menor a 10^{-6} presentaron incontables colonias mientras que con las posteriores a 10^{-8} no presentaron crecimiento por lo que se decidió elegir la dilución correspondiente a 10^{-8} para inocular las muestra de las diferentes marcas de sanitizantes, aun estando está por debajo del rango intermedio de las colonias requeridas por la norma para llevar acabo la determinación de las células sobrevivientes, con el único fin de establecer las condiciones de trabajo para la prueba.

Cuadro 9.1 Montaje de la técnica. Cuenta inicial *Escherichia coli*

Dilución realizada	No. de colonias en placa	No. de colonias en placa (duplicado)
10^{-14}	0	0
10^{-12}	0	0
10^{-10}	0	0
10^{-8}	7	8
10^{-6}	739	698
10^{-4}	Incontables	Incontables
10^{-2}	Incontables	Incontables

- Dilución elegida para el estudio.

Se observa que en las diluciones correspondientes a 10^{-2} y 10^{-4} no es posible contar el número de colonias mientras que las diluciones correspondientes a 10^{-10} , 10^{-12} y 10^{-14} no hay crecimiento de bacterias, por lo que las diluciones 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} son las más representativas para este estudio. Ninguna dilución dio como resultado un número de colonias entre 25 y 250 por lo que se propuso realizar una nueva dilución a partir de la correspondiente a 10^{-6} para obtener un número de colonias que entre el rango establecido por la norma para los siguientes estudios.

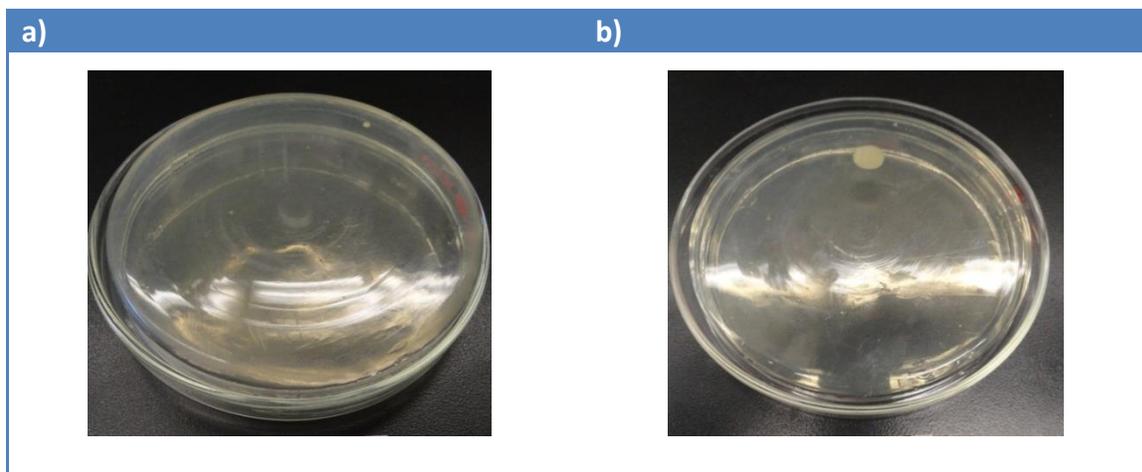


Figura 3. Placas de la dilución 10^{-8} para la determinación de cuenta viable inicial para el montaje de la técnica con la cepa de *Escherichia coli*: **a)** Placa No. 1 con 7×10^8 UFC /mL, **b)** Placa No. 2 con 8×10^8 UFC /mL.

En la determinación de las células sobrevivientes de *Escherichia coli* al estar en contacto con las diferentes marcas de sanitizantes durante 30 segundos, se obtuvieron los resultados que se muestran en el cuadro 9.2. Las marcas de sanitizantes Clorox, Cloralex, Los patitos y Great Value no presentaron ningún crecimiento de colonias, obteniendo de esta forma un porcentaje de reducción del 100%, sin embargo es difícil determinar si estos resultados fueron obtenidos debido a la actividad antimicrobiana de las diferentes marcas de desinfectantes o a la dilución seleccionada, que se encontraba por debajo del rango requerido por la norma para el conteo del número de colonias en placa por lo que en los estudios posteriores se propone realizar una dilución que cumpla con esta especificación.

Cuadro 9.2 Determinación de las células sobrevivientes de *Escherichia coli*

Marca de NaClO	No. de colonias en placa	Porcentaje de reducción	Promedio de porcentaje de reducción
Clorox	0	100	100
	0	100	
Cloralex	0	100	100
	0	100	
Los patitos	0	100	100
	0	100	
Great Value	0	100	100
	0	100	

En ninguna de las ocho placas se observó crecimiento de bacterias (Anexo III), esto pudo deberse a la cantidad de microorganismos presentes en la dilución elegida por lo que se propuso realizar una dilución que cumpla con las especificaciones descritas en la norma y realizando exactamente las mismas condiciones de trabajo establecidas en el montaje de la técnica, para los posteriores estudios y así poder determinar la eficacia de las diferentes marcas de sanitizantes.

9.1.2. Determinación de células sobrevivientes. *Escherichia coli*.

Para la determinación del porcentaje de reducción, se sometió a la prueba de cuenta viable inicial especificada en la Norma Mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999 de la cepa de *Escherichia coli* con la que se evaluó la actividad antimicrobiana a partir de una suspensión que leída a 580 nm dio una lectura de 6% de transmitancia, donde a partir de esta suspensión se realizó por duplicado, una serie de diluciones para obtener el número de colonias requerido por la norma, que se encuentra en un rango entre 25 y 250, en el cuadro 10.1 se encuentran las colonias en placa obtenidas a diferentes diluciones. En la dilución 10^{-6} se obtuvo un total de 446 colonias y 393 colonias para su duplicado; en la dilución 10^{-8} se obtuvo un total de 9 colonias y 13 colonias para su duplicado, aquellas que fueron menor a 10^{-6} presentaron incontables colonias, mientras que con las posteriores a 10^{-8} no presentaron crecimiento, por lo que se decidió proponer una nueva dilución (1:1) a partir de la dilución 10^{-6} para entrar en el rango intermedio de las colonias requeridas por la norma que es de 25 a 250 para inocular las muestras de las diferentes marcas de sanitizantes y llevar a cabo la determinación de células sobrevivientes, obteniendo un total de 82 colonias y 96 colonias para su duplicado, para esta nueva dilución.

Cuadro 10.1. Cuenta inicial *Escherichia coli*

Dilución realizada	No. de colonias en placa	No. de colonias en placa (duplicado)
10^{-14}	NR	NR
10^{-12}	NR	NR
10^{-10}	NR	NR
10^{-8}	13	9
10^{-6} *	446	393
10^{-4}	Incontables	Incontables
10^{-2}	NR	NR
DP 10^{-7}	82	96

▣ Dilución elegida para el estudio.

* Tomar 3 mL de solución 10^{-6} y ajustar con 3 mL de solución salina (1:1)

DP: Dilución propuesta

NR: No se realizó

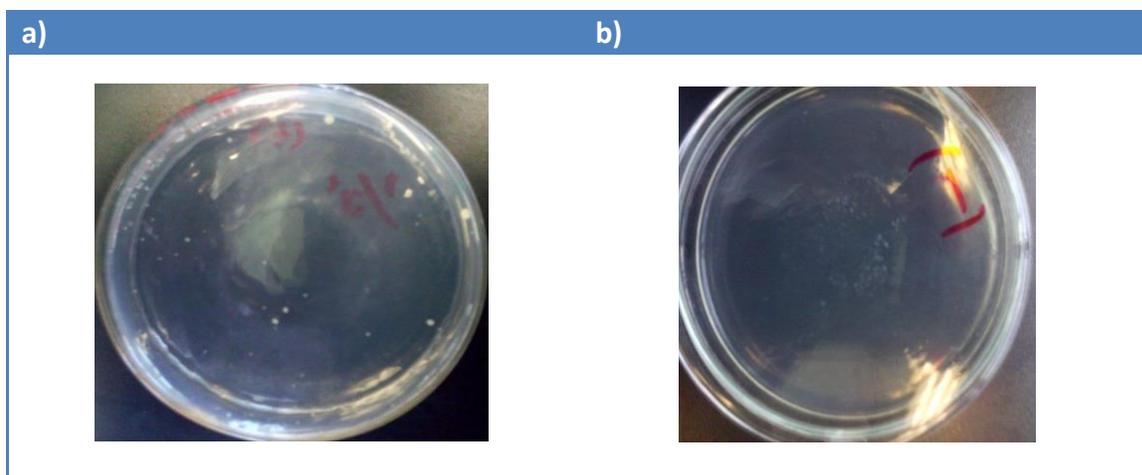


Figura 4. Placas de dilución propuesta DP, para la determinación de cuenta viable inicial con la cepa de *Escherichia coli*: **a)** Placa No. 1 con 8.2×10^8 UFC /mL, **b)** Placa No. 2 con 9.6×10^8 UFC /mL.

En la determinación de las células sobrevivientes de *Escherichia coli* al estar en contacto con las diferentes marcas de sanitizantes durante 30 segundos, se obtuvieron los resultados que se muestran en el cuadro 10.2. Las marcas de sanitizantes Clorox, Cloralex y Los patitos, no presentaron ningún crecimiento de colonias, obteniendo de esta forma un porcentaje de reducción del 100%, sin embargo la marca Great Value solo presentó una actividad antimicrobiana del 98.78%.

Cuadro 10.2 Determinación de las células sobrevivientes de *Escherichia coli*

Marca de NaClO	No. de colonias en placa	Porcentaje de reducción	Promedio de porcentaje de reducción
Clorox	0	100	100
	0	100	
Cloralex	0	100	100
	0	100	
Los patitos	0	100	100
	0	100	
Great Value	2	97.56	98.78
	0	100	

En seis de las ocho placas no se observó la presencia de colonias, la placa correspondiente a la marca Great Value presentó crecimiento (Anexo IV), por lo tanto las marcas de sanitizantes; Clorox, Cloralex y Los patitos son efectivos capaces de eliminar en al menos un 99% la bacteria de *Escherichia coli* de acuerdo con la norma NMX-BB-040-SCFI-1999, pero no la marca Great Value.

9.1.3. Determinación de células sobrevivientes. *Staphylococcus aureus*.

Los siguientes resultados son de la cuenta viable inicial de la cepa *Staphylococcus aureus* partiendo de una suspensión que al leerla en espectrofotómetro a 580 nm se obtuvo una lectura de 7% de transmitancia, donde a partir de esta suspensión se realizó por duplicado, una serie de diluciones para obtener el número de colonias requerido por la norma, que se encuentra en un rango entre 25 y 250, en el cuadro 11.1 se encuentran las colonias observadas a diferentes diluciones. En la dilución 10^{-6} se obtuvo 868 colonias y 796 colonias para su duplicado; en la dilución 10^{-8} se obtuvo un total de 20 colonias y 17 colonias para su duplicado, aquellas que fueron menor a 10^{-6} presentaron incontables colonias, mientras que con las posteriores a 10^{-8} no presentaron crecimiento, por lo que se decidió proponer una nueva dilución (1:1) a partir de la dilución 10^{-6} , para entrar en el rango intermedio de las colonias requeridas que es de 25 a 250 para inocular las muestras de las diferentes marcas de sanitizantes y llevar a cabo la determinación de células sobrevivientes, obteniendo un total de 69 colonias y 56 colonias para su duplicado, para esta nueva dilución.

Cuadro 11.1. Cuenta inicial *Staphylococcus aureus*

Dilución realizada	No. de colonias en placa	No. de colonias en placa (duplicado)
10^{-14}	NR	NR
10^{-12}	NR	NR
10^{-10}	NR	NR
10^{-8}	13	9
10^{-6} *	446	393
10^{-4}	Incontables	Incontables
10^{-2}	NR	NR
DP 10^{-7}	69	56

▣ Dilución elegida para el estudio.

* Tomar 3 mL de solución 10^{-6} y ajustar con 3 mL de solución salina (1:1).

DP: Dilución propuesta

NR: No se realizó

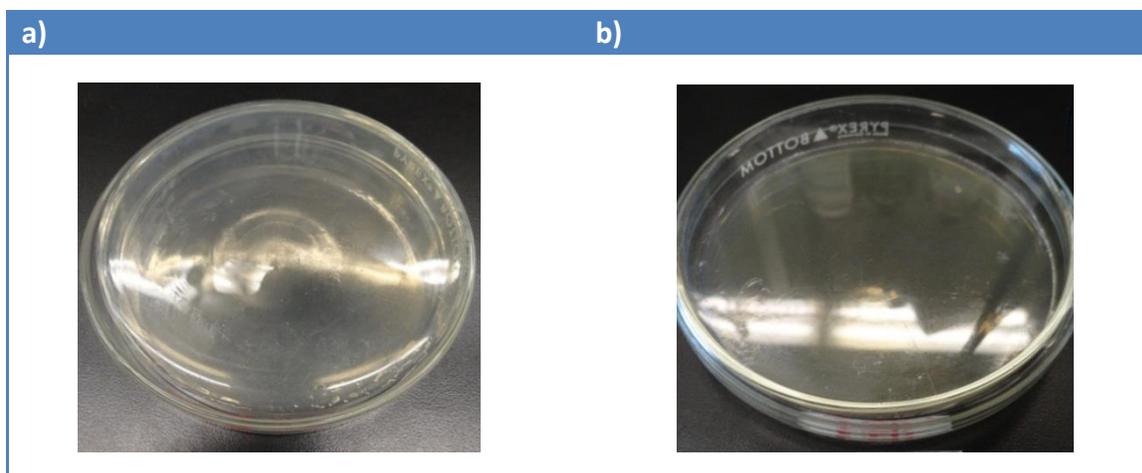


Figura 5. Placas de dilución propuesta DP, para la determinación de cuenta viable inicial con la cepa de *Staphylococcus aureus*: **a)** Placa No.1 con 6.9×10^8 UFC /mL, **b)** Placa No. 2 con 5.6×10^8 UFC /mL.

En la determinación de las células sobrevivientes de *Staphylococcus aureus* al estar en contacto con las diferentes marcas de sanitizantes durante 30 segundos, se obtuvieron los resultados que se muestran en el cuadro 11.2. Las marcas de sanitizantes Clorox, Cloralex y Los patitos, no presentaron ningún crecimiento de colonias, obteniendo de esta forma un porcentaje de reducción del 100%, sin embargo la marca Great Value no sucedió lo mismo ya que solo presentó una actividad antimicrobiana del 98.38%.

Cuadro 11.2 Determinación de las células sobrevivientes de *Staphylococcus aureus*

Marca de NaClO	No. de colonias en placa	Porcentaje de reducción	Promedio de porcentaje de reducción
Clorox	0	100	100
	0	100	
Cloralex	0	100	100
	0	100	
Los patitos	0	100	100
	0	100	
Great Value	1	98.55	98.38
	1	98.21	

En seis de las ocho placas no se observó la presencia de colonias solo las placas de la marca Great Value si presentó crecimiento (Anexo IV), por lo tanto las marcas de sanitizantes; Clorox, Cloralex y Los patitos son efectivos capaces de eliminar en al menos un 99% la bacteria de *Staphylococcus aureus* de acuerdo a norma NMX-BB-040-SCFI-1999, pero no la marca Great Value.

Con los resultados obtenidos al evaluar la actividad antimicrobiana utilizando las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en el cuadro 12.

Cuadro 12. Resultados de la prueba de Actividad antimicrobiana de los sanitizantes evaluados de acuerdo a la norma NMX-BB-040-SCFI-1999

Marca de NaClO	Porcentaje de reducción con la cepa		Dictamen
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Clorox	100	100	Cumple
Cloralex	100	100	Cumple
Los patitos	100	100	Cumple
Great Value	98.78	98.38	No cumple

La marca sanitizante Great Value no cumplió con un porcentaje de reducción del 99.999% al estar 30 segundos de contacto dictada por la norma NMX-BB-040-SCFI-1999 para productos germicidas, por lo tanto no es capaz de eliminar eficientemente los microorganismos de prueba, ya que posiblemente se requiere de mayor tiempo de contacto para observar una disminución más eficaz o aumentar la concentración del producto. Mientras que las marcas sanitizantes; Clorox, Cloralex y Los patitos presentaron un porcentaje de reducción del 100% por lo que su uso es confiable para una disminución del 99.999% de los microorganismos existentes a los 30 segundos de contacto y según lo estipulado por el test de Chambers¹³ son buenos desinfectantes, ya que este considera como buen desinfectante un producto que, a la concentración recomendada, cause un 99.9996% de muerte a una cantidad entre 7.5×10^7 y 1.3×10^8 UFC/ml en 30 segundos.

10. CONCLUSIONES

- Se estableció un procedimiento con base en la norma NMX-BB-040-SCFI-1999, que permite evaluar la efectividad de diferentes marcas de sanitizantes a base de Hipoclorito de sodio usados en los laboratorios de investigación de la UMIEZ de la FES Zaragoza.
- En cuanto a la determinación del porcentaje de reducción de microorganismo en la cuenta viable inicial y en las células sobrevivientes se encontró que tres de las cuatro marcas analizadas de hipoclorito de sodio (Clorox, Cloralex, Los patitos) cumplen satisfactoriamente al eliminar el 99.999% de los microorganismos de prueba, por lo que las marcas Cloralex y Los patitos son igualmente eficaces que el sanitizante de la marca líder pero no así la marca Great Value al tener sólo un 98.95% de eliminación, por lo que no cumple con los criterios establecidos por la norma mexicana.
- Al evaluar las diferentes marcas de sanitizantes usados en los laboratorios de la UMIEZ de la FES Zaragoza las marcas de hipoclorito de sodio que tiene mayor efectividad en cuanto a número de biocarga eliminada son Clorox, Cloralex y Los patitos, por tanto “Los patitos” es el sanitizante idóneo para la limpieza de los laboratorios por el costo/beneficio ya que este es el de menor costo en el mercado, de fácil acceso y puede sustituir al sanitizante de la marca líder.

11. RECOMENDACIONES

Se propone la utilización de hipoclorito de sodio de la marca “Los patitos” a una concentración de 1000 ppm (1:50), como solución sanitizante para los laboratorios de investigación de la FES Zaragoza, por ser la concentración óptima a la que esta marca eliminó el 100% de biocarga y debido a que el costo* de esta es menor a las otras marcas de mayor renombre y con la misma eficacia, por lo que es recomendable para las diferentes áreas de trabajo dentro de la UMIEZ.

*Costo aproximado por 1L. de Hipoclorito de sodio, Febrero 2014:

Clorox	\$8.50
Cloralex	\$10.50
Los patitos	\$7.00
Great Value	\$7.00

9. REFERENCIAS

1. Reducción de riesgos en salud por manipulación de cloro utilizando entrenamiento basado en las tecnologías de la información y la comunicación [consultado el 1 de Febrero de 2014] Disponible en: http://www.colombiaaprende.edu.co/html/mediateca/-1607/articles-74629_archivo.pdf
2. Barrientos F. Evaluación de la actividad antimicrobiana de tres sanitizantes usados en los laboratorios de Microbiología General II y Laboratorio I planta alta de la UMIEZ de la FES Zaragoza.[Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo] México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México. FES Zaragoza; 2013.
3. Comisión Interinstitucional de Buenas Prácticas de Fabricación, *Procesos de Limpieza y su Validación en Áreas de Fabricación*. México: CIPAM, 1999
4. Delgado E., Díaz P. Elaboración y documentación del programa de limpieza y desinfección de los laboratorios del departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana [Trabajo de grado para optar al título de Microbiología Industrial] Bogotá D.C Pontificia Universidad Javeriana; 2009
5. William A., Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008;8-9
6. Wildbrett Limpieza y desinfección en la Industria Alimentaria, Editorial Acirbia, S.A Zaragoza (España).
7. Vellutato A. *Utilizing Environmental Monitoring data to implement a Cleaning and Disinfection Program*, México: en Farma; 2009
8. Perez D. Revisión y actualización del programa de limpieza y desinfección de Anglopharma S.A. [Trabajo de grado para optar al título de Microbiología Industrial] Bogotá D.C Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
9. Organización: Mundial de Salud, *Manual de bioseguridad en el laboratorio*. [Libro en internet]. 3a ed. Ginebra; 2005 [Consultado el 12 de febrero 2014]. Disponible en http://www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/lab-biosafety_omsspa.pdf.
10. Jimenez L. Swarbrick J. *Microbial Contamination Control in the pharmaceutical Industry*. U.S.A: Marcel Dekker; 2004
11. Gonzales M. *Diseño e implementación del programa de control microbiológico en el área de microbiología de un laboratorio farmacéutico* [Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo] México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México. FES Zaragoza; 2011.
12. Secretaria Distrital de Salud, Dirección de Salud Pública, Alcaldía mayor de Bogotá *Guías para la prevención, control y vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias Uso de desinfectantes*. <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Todo%20IIH/007%20Desinfectantes.pdf>

13. Ayres J.C., Mundt J.O., Sandine W.E. *Microbiology of Foods*. United States American: WH Freeman & Co. 1980
14. Secretaria Distrital de Salud, Dirección de Salud Pública, Alcaldía mayor de Bogotá Limpieza y desinfección de equipos y superficies ambientales en instituciones prestadoras de servicios de salud
[.http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Todo%20IH/Limpieza%20y%20Desinfección%20de%20Equipos%20y%20Superficies.pdf](http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Todo%20IH/Limpieza%20y%20Desinfección%20de%20Equipos%20y%20Superficies.pdf)
15. Moffat A., Osselton D., Widdop B. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 3a ed. United States American: Pharmaceutical Press; 2004
16. Wolfgang K., Phil D., Hilda P. *et. al, Microbiología*. 20a ed. Argentina: Panamericana; 1998
17. Ingraham J, Ingraham C. *Introducción a la microbiología*. España: Reverté S.A. 1998
18. Universidad de Pamplona Centro de Preparación de Medios. Manual de Limpieza y Desinfección.[Internet]http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/hermesoft/portallG/home_9/recursos/01_general/contenidos/laboratorios/guiasyfichas/25022008/manualdelimpiezaydesinfeccion.pdf.
19. Blook S. *Desinfection, sterilization and preservation*. 4a ed. United States American: Lea & Fegiber; 1994
20. Sánchez S, Sáenz A. *Antisépticos y desinfectantes*. [Revista en internet]. Dermatología Peruana. Vol. 15 N.2; 2005 [consultada el 18 de Febrero de 2014]. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v15_n2/pdf/a02.pdf
21. Esteripharma. *Sanitización de alto nivel*. [Artículo en internet] Esteripharma México S.A de C.V [Consultado el 18 de Febrero de 2014]. Disponible en http://www.esteripharma.com/Pdf_View.php?Concepto=20&Archivo=sanitizacion%20de%20alto%20nivel.pdf.
22. MCD LAB. *Agar Nutritivo*. [Manual técnico en internet] MCD LAB S.A. de C.V. México. [Consultado el 13 de Marzo de 2014] Disponible en <http://www.mcd.com.mx/pdfs/AGAR%20NUTRITIVO.pdf>.
23. Gobierno Federal de México. NMX-BB-040-SCFI-1999 [Base de datos en Internet]. Diario Oficial de la Federación. [Consultado el 3 de Febrero de 2014]. Disponible en <http://200.77.231.100/work/normas/nmx/1999/nmx-bb-040-scfi-1999.pdf>.
24. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 9a ed. México: Secretaria de salud; 2008
25. The cholrinde institute, Hipoclorito de sodio [consultado el 15 de Febrero de 2014] Disponible en <http://www.minambiente.gov.co/documentos/Guia18.pdf>.
26. The cholrinne Institute, lista de materiales incompatibles [consultado el 14 de Febrero de 2014] Disponible en http://www.cl2.com/index.php/about-us/public-files/doc_download/118-incompatibility-chart-spanish1

27. Norma Mexicana NMX-K-620-NORMEX-2008, Productos de aseo-desinfectante y blanqueador liquido concentrado, formulado con hipoclorito de sodio a una concentración del 6.0% de cloro activo especificaciones y métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación (México), 02 de abril de 2009.
28. USP31–NF26 Page 3251 Pharmacopeial Forum: Volume No. 28(2) pag 366
29. Madigan M., Martinko J., Parker J. Brock: *Biología de los microorganismos*. 10a ed. España: Pearson-Prentice hall; 2003
30. Prescott L., Harley J., Klein D. Microbiology. 5a ed. United States American: McGraw-Hill; 2002
31. Kennet J, Ryan C. George R. *Microbiología Médica: una introducción a las enfermedades infecciosas*. 4ª Edición. México: Mc Graw Hill; 2005.
32. Romero C. *Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. 3a ed. México: Médica Panamericana; 2007
33. Kenneth J. Sherris, *Microbiología Médica*. 4a ed. México: Mac Graw Hill; 2007
34. Quentin N., Russell S. *Bacteriología y micología médicas*. 2a ed. México: Interamericana; 1991
35. Jawetz M. *Microbiología Médica*. 25ª edición. México: Mc Graw Hill; 2011.
36. Delaat A. *Microbiología*. 2a ed. México: Interamericana; 1983
37. Mora G. L. Manual de bioseguridad y control de la infección para la práctica odontológica, UNAM FEZ ZARAGOZA, 1996;13
38. Hipoclorito de sodio en irrigación de conductos radiculares: Sondeo de opinión [consultado el 28 de Enero de 2014] Disponible en: <http://www.revistas.unam.mx/index.php/rom/article/view/34197>
39. Meza F. *Desinfectantes químicos*. [Boletín técnico en internet]. Provinas S.A de C.V [Consultado el 10 de Febrero de 2014]. Disponible en: <http://www.provinas.net/files/boletin tecnico 002.pdf>.
40. *Nefelobac*. *Escala nefelométrica de Mc Farland*. [Artículo en n línea] Probac S.A de C.V Brasil. [Consultado el 19 de Marzo de 2014]. Disponible en: <http://www.probac.com.br/bulas/nefelobac.pdf>.

GLOSARIO¹⁶

Antiséptico: agente químico que puede inhibir o destruir microorganismos, no es eficaz contra las endosporas bacterianas y se utiliza en el tejido vivo. Los antisépticos son los mismos que los desinfectantes excepto que pueden ser utilizados en los seres vivientes.

ATCC: American Type Culture Collection.

Biocida: agente químico que mata todos los microorganismos vivos, incluidas las endosporas bacterianas.

Bioestático: agente químico que inhibe la proliferación microbiana pero no destruye los microorganismos.

Descontaminación: Proceso por el cual se elimina la carga microbiana, puede referirse a un proceso mecánico, sanitización, desinfección o la esterilización.

Desinfección: Es la eliminación de microorganismos infecciosos remanentes en objetos inanimados o la reducción de los mismos a niveles que no constituyan un peligro para la salud pública.

Esporicida: agente químico que mata los microorganismos, incluyendo las endosporas bacterianas. Este término es sinónimo de biocida.

Germicida: agente químico que mata los organismos patógenos, no es esporicida, el término puede aplicarse a las sustancias utilizadas en los tejidos vivos (antisépticos) y sobre los objetos inanimados (desinfectantes). La palabra germicida no se utiliza comúnmente en la industria farmacéutica.

Limpieza es la eliminación de la suciedad visible (por ejemplo, material orgánico e inorgánico) de los objetos y las superficies y, normalmente, se lleva a cabo manualmente o mecánicamente usando agua con detergentes o productos enzimáticos.

Sanitización: Es la acción de eliminar o reducir los niveles de partículas viables por medio físicos o químicos posteriores a la limpieza. En la industria farmacéutica, el término se utiliza para los procesos que proporcionan una reducción de 3-log en la carga microbiana.

Tiempo de acción. Tiempo de exposición requerido para que el producto cumpla con el objetivo.

ANEXO I PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y MEDIOS

Agar nutritivo (1 L)

- Peptona de Gelatina 5.0 g
- Extracto de Carne 3.0 g
- Agar bacteriológico 15.0 g
- pH 6.8 ± 0.2

“Preparación: Suspender 23 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121° C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre $45-50^{\circ}$ C y vaciar en placas de Petri estériles.”²³

Agar Soya-tripticaseína (1 L)

- Peptona de Caseína 15.0
- Peptona de Soya 5.0
- Cloruro de Sodio 5.0
- Agar Bacteriológico 15.0
- pH 7.3 ± 0.2

“Preparación: Suspender 40 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121° C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre $45-50^{\circ}$ C y vaciar en placas de Petri estériles.”²³

Caldo soya-tripticaseína (1 L)

- Peptona de Caseína 17.0
- Peptona de Soya 3.0
- Cloruro de Sodio 5.0
- Fosfato Dipotásico 2.5

“Preparación: Suspender 30 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Verter en los recipientes o tubos requeridos y esterilizar en autoclave 121° C (15 libras de presión) durante 15 minutos.”²³

Solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M (1 L)

- Fosfato monobásico de potasio 34 g
- Agua destilada 1000 mL
- Solución de hidróxido de sodio 1.0 N

“Preparación: En un matraz volumétrico de 1 000 mL, disolver 34 g de fosfato monobásico de potasio en 500 mL de agua, ajustar el pH entre 7.1 y 7.3 con la solución de hidróxido de sodio, aforar con agua, mezclar. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 min., dejar enfriar y conservar en refrigeración.”²³

Solución amortiguadora de fosfatos diluida (1 L)

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M
- Agua destilada

“Preparación: Colocar 1.25 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M en un matraz volumétrico de 1 L y llevar a volumen con agua, mezclar y distribuir en porciones de 9 mL en tubos y/o matraces y esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 min.”²³

Hidróxido de sodio 1.0 N (1 L)

- NaOH 40 g en 1000 mL

“Preparación: En un vaso de precipitados disolver 42 g de hidróxido de sodio con 150 mL de agua libre de dióxido de carbono, dejar enfriar la solución a temperatura ambiente, pasar a un matraz volumétrico de 1000 mL y llevar a volumen con agua libre de dióxido de carbono.”²³

Agar para métodos estándar (1 L)

- Peptona de caseína 5.0 g
- Dextrosa 1.0 g
- Extracto de levadura 2.5 g
- Agar bacteriológico 15.0 g
- pH 7.0 ± 0.2

“Preparación: Suspender 23.5 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121° C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50° C y vaciar en placas de Petri estériles.”²³

Solución neutralizante concentrada (1 L)

- Azolecitina 40 g
- Polisorbato 80 280 mL
- Solución amortiguadora de fosfatos 1.25 mL
- Solución valorada de hidróxido de sodio 1.0 N
- Solución valorada ácido clorhídrico 1.0 N

“Preparación: Mezclar 40 g de azolecitina, con 280 mL de polisorbato 80 y 1.25 mL de la solución amortiguadora de fosfatos, diluir con agua hasta obtener un volumen final de un 1 L; ajustar el pH a 7.2 con la solución volumétrica de hidróxido de sodio o la solución volumétrica de ácido clorhídrico. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 20 min.”²³

Solución neutralizante diluida

- Solución neutralizante concentrada 100 mL
- Solución amortiguadora de fosfatos 0,25 M 25 mL
- Agua 1 675 mL

“Preparación: Mezclar 100 mL de la solución neutralizante concentrada con 25 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 0,25 M, adicionar 1 675 mL de agua, mezclar y distribuir en porciones de 9 mL en tubos con rosca de 20 mm x 150 mm. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 20 min.”²³

Ácido clorhídrico 1.0N (1 L)

- HCl 36.46 g en 1000 mL.

“Preparación: En un matraz volumétrico de 1000 mL, depositar 200 mL de agua, agregar lentamente 85 mL de ácido clorhídrico. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con agua.”²³

ANEXO II ESCALA DE McFARLAND

Esta escala es utilizada para determinar la intensidad de proliferación de bacterias en medios de cultivo líquidos, esta multiplicación es manifestada por el aumento de partículas (bacterias) que se oponen al libre paso de la luz, causando turbidez o la opacidad en el centro. Cuanto mayor sea el número de bacterias, mayor es la opacidad del medio.³⁴

Consiste en una serie numerada de 10 tubos, basada en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico con diferentes cantidades de cloruro de bario y ácido sulfúrico para obtener diferentes concentraciones de sulfato de bario, que corresponden a diferentes recuentos bacterianos. La equivalencia de UFC/mL varía dependiendo de la concentración de cloruro de bario y ácido sulfúrico.

Escala de Mc Farland

TUBO	Cl ₂ Ba 1%	SO ₄ H ₂ 1%	U.F.C/mL
1	0,1	9,9	3,0x10 ⁸
2	0,2	9,8	6,0x10 ⁸
3	0,3	9,7	9,0x10 ⁸
4	0,4	9,6	1,2x10 ⁹
5	0,5	9,5	1,5x10 ⁹
6	0,6	9,4	1,8x10 ⁹
7	0,7	9,3	2,1x10 ⁹
8	0,8	9,2	2,4x10 ⁹
9	0,9	9,1	2,7x10 ⁹
10	1,0	9,0	3,0x10 ⁹

Procedimiento: Comparar los tubos a simple vista con el tubo de bacterias. Antes, agitar los tubos vigorosamente, debido a que el sulfato de bario tiende a precipitar. También homogenizar el tubo con el cultivo bacteriano, para tener una suspensión (aspecto turbio) uniforme.

Es recomendable realizar las lecturas de cada tubo y compararlos entre sí, colocándolos en contra de una hoja blanca con texto impreso de modo que una mayor o menor claridad de las letras indicara una mayor o menor turbidez.⁴⁰

ANEXO III Placas de las diferentes marcas de sanitizantes evaluados.

A continuación se muestran las placas de las diferentes marcas de sanitizantes que se evaluaron con la cepa de *Escherichia coli* para el montaje de la técnica para la determinación de células sobrevivientes.

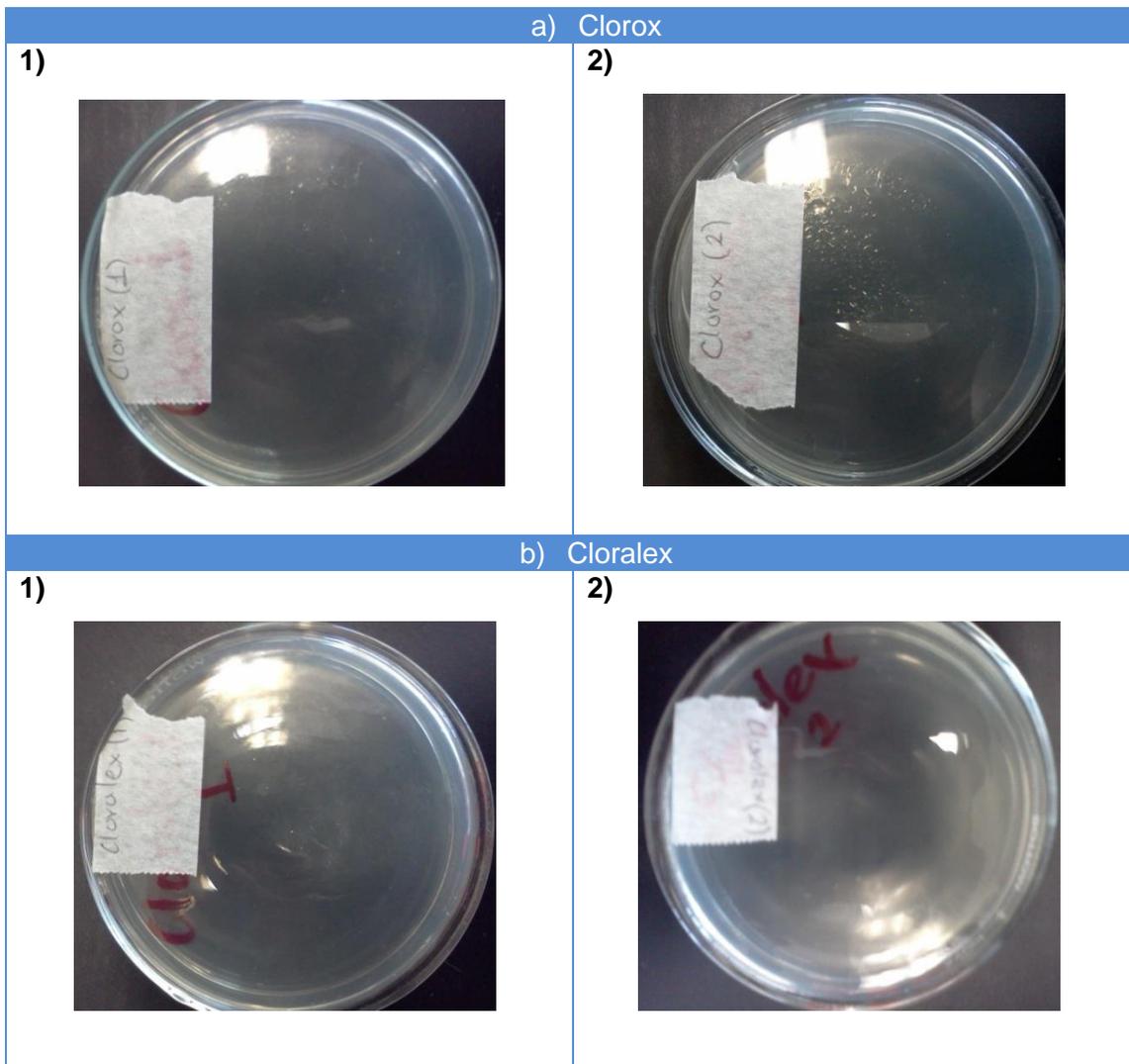


Figura 1.1 Placas de las marcas de sanitizantes que se evaluaron con la cepa de *Escherichia coli* para el montaje de la técnica para la determinación de las células sobrevivientes: **a)** Clorox placa No.1 sin crecimiento, placa No.2 sin crecimiento **b)** Cloralex placa No.1 sin crecimiento, placa No.2 sin crecimiento.

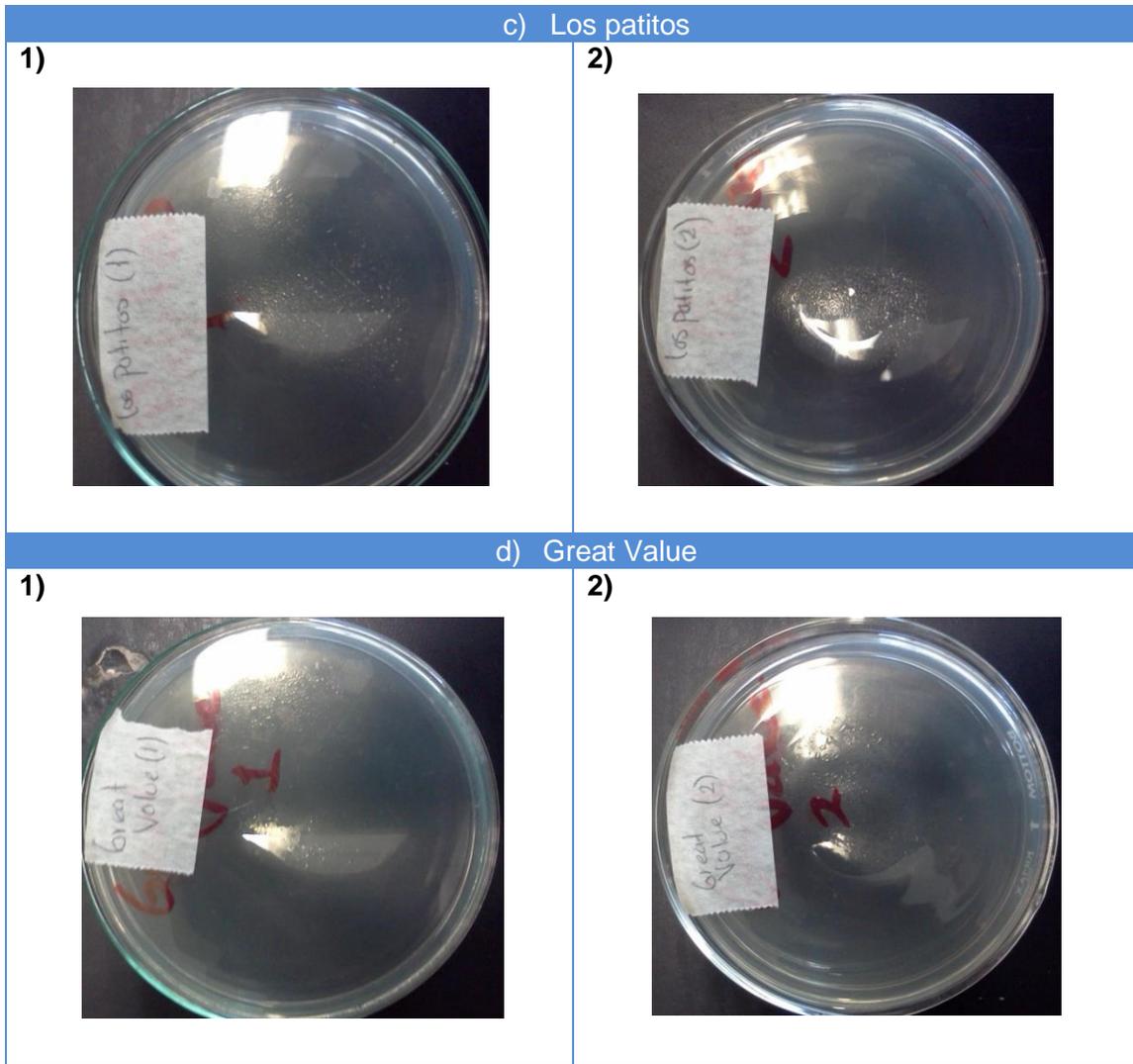


Figura 1.2 Placas de las marcas de sanitizantes que se evaluaron con la cepa de *Escherichia coli* para el montaje de la técnica para la determinación de las células sobrevivientes: **d)** Great Value placa No.1 sin crecimiento, placa No.2 sin crecimiento

ANEXO IV Placas de las diferentes marcas de sanitizantes evaluados.

A continuación se muestran las placas de las diferentes marcas de sanitizantes que se evaluaron con la cepa de *Escherichia coli* para la determinación de células sobrevivientes.

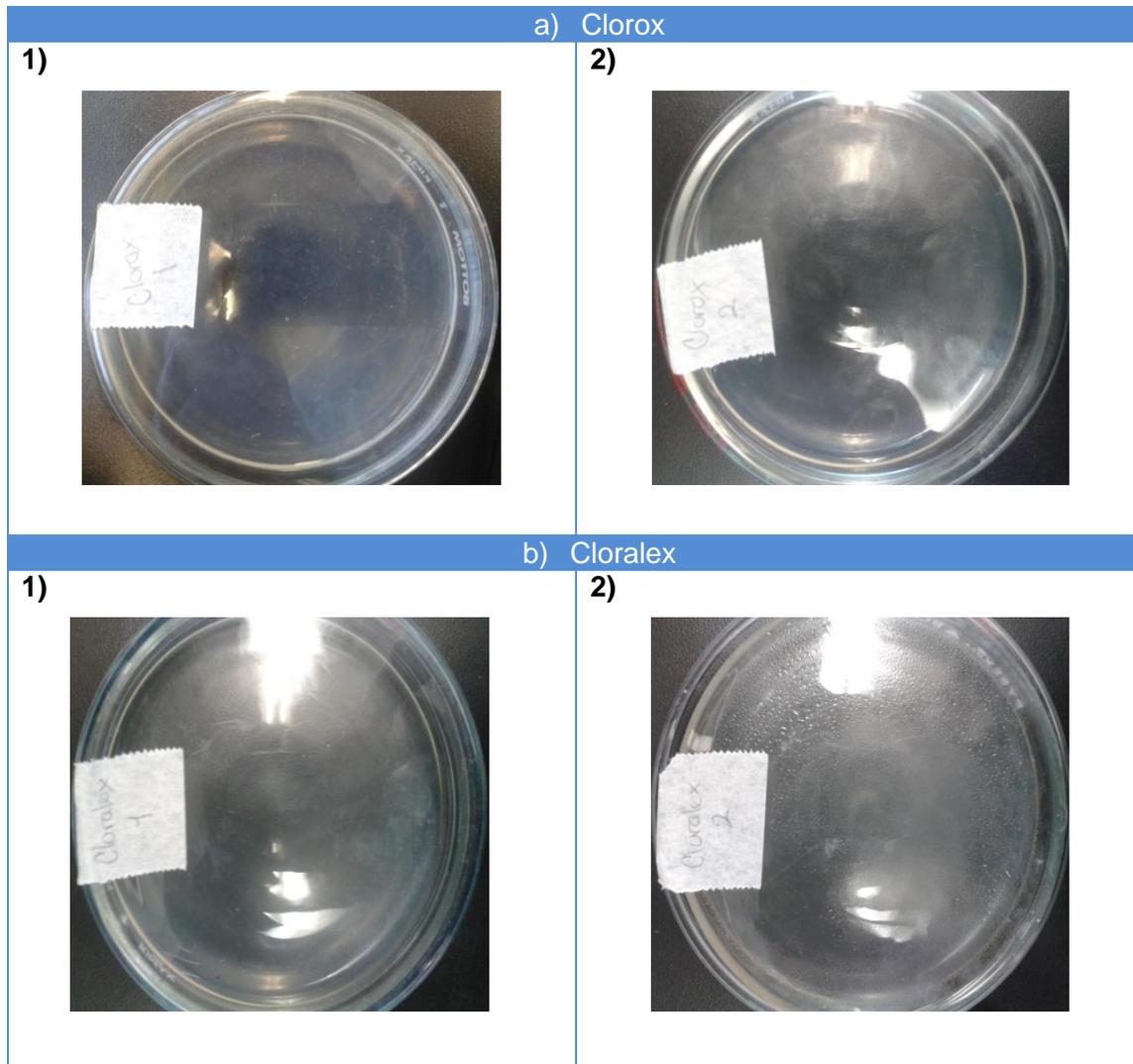


Figura 2.1 Placas de las marcas de sanitizantes que se evaluaron con la cepa de *Escherichia coli* para la determinación de las células sobrevivientes: **a)** Clorox placa No.1 sin crecimiento, placa No.2 sin crecimiento **b)** Cloralex placa No.1 sin crecimiento, placa No.2 sin crecimiento.

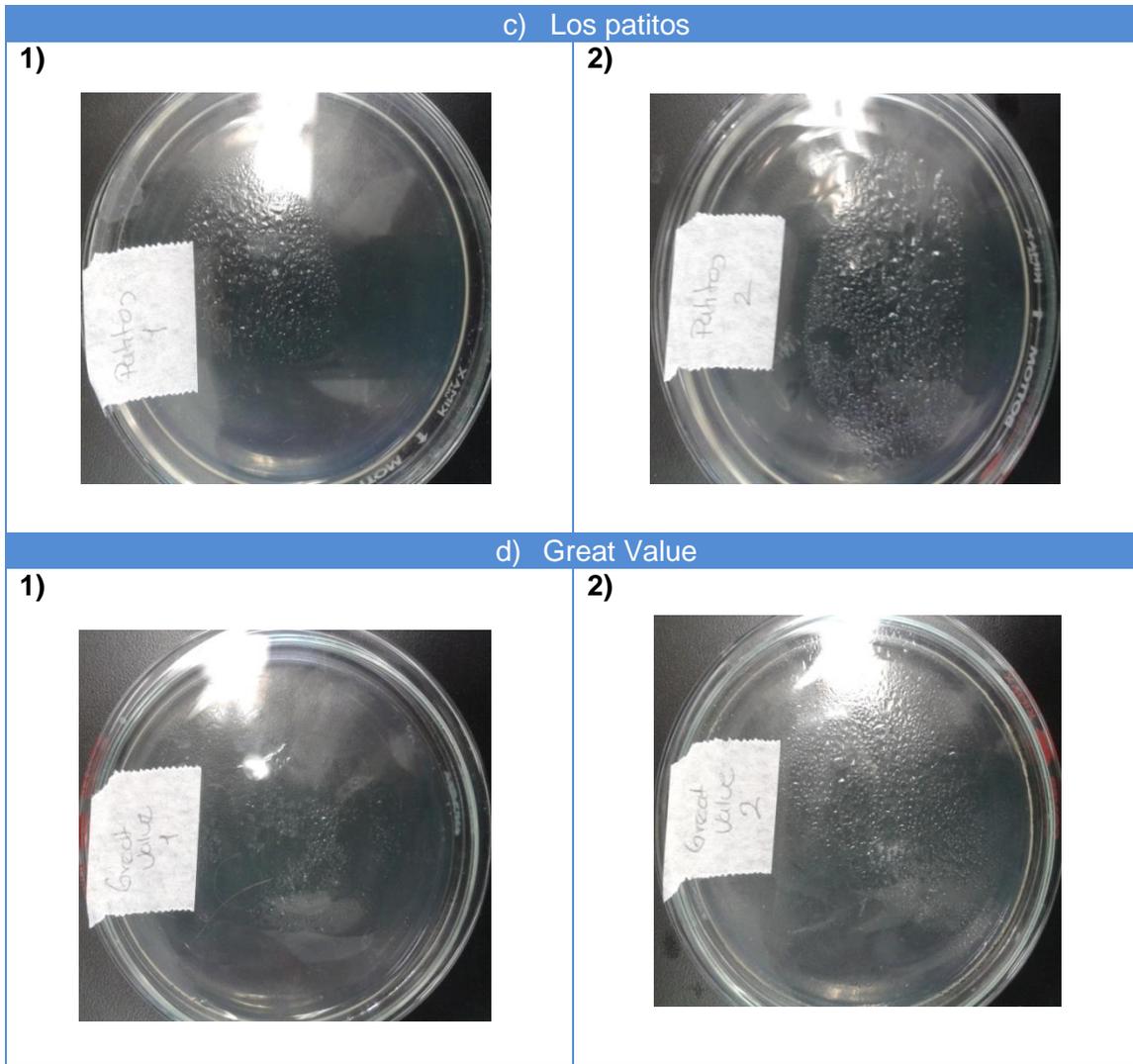


Figura 2.2 Placas de las marcas de sanitizantes que se evaluaron con la cepa de *Escherichia coli* para el montaje de la técnica para la determinación de las células sobrevivientes: **c)** Los patitos placa No.1 sin crecimiento, placa No.2 sin crecimiento **d)** Great Value placa No.1 con crecimiento, placa No.2 sin crecimiento.

ANEXO V Placas de las diferentes marcas de sanitizantes evaluados.

A continuación se muestran las placas de los sanitizantes que se evaluaron con la cepa de *Staphylococcus aureus* para la determinación de células sobrevivientes.

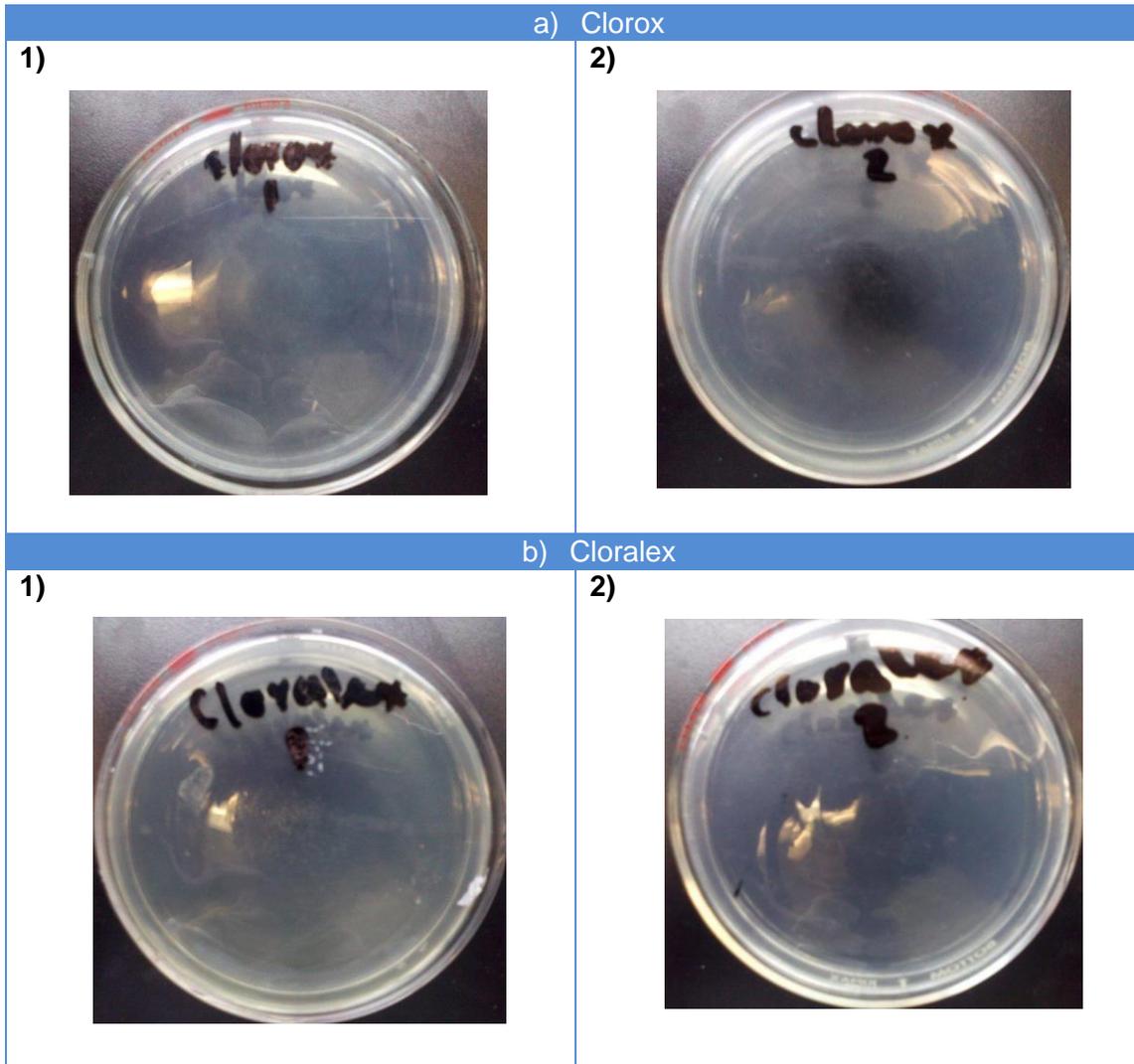


Figura 3.1 Placas de las marcas de sanitizantes que se evaluaron con la cepa de *Staphylococcus aureus* para la determinación de las células sobrevivientes: **a)** Clorox placa No.1 sin crecimiento, placa No.2 sin crecimiento **b)** Cloralex placa No.1 sin crecimiento, placa No.2 sin crecimiento.

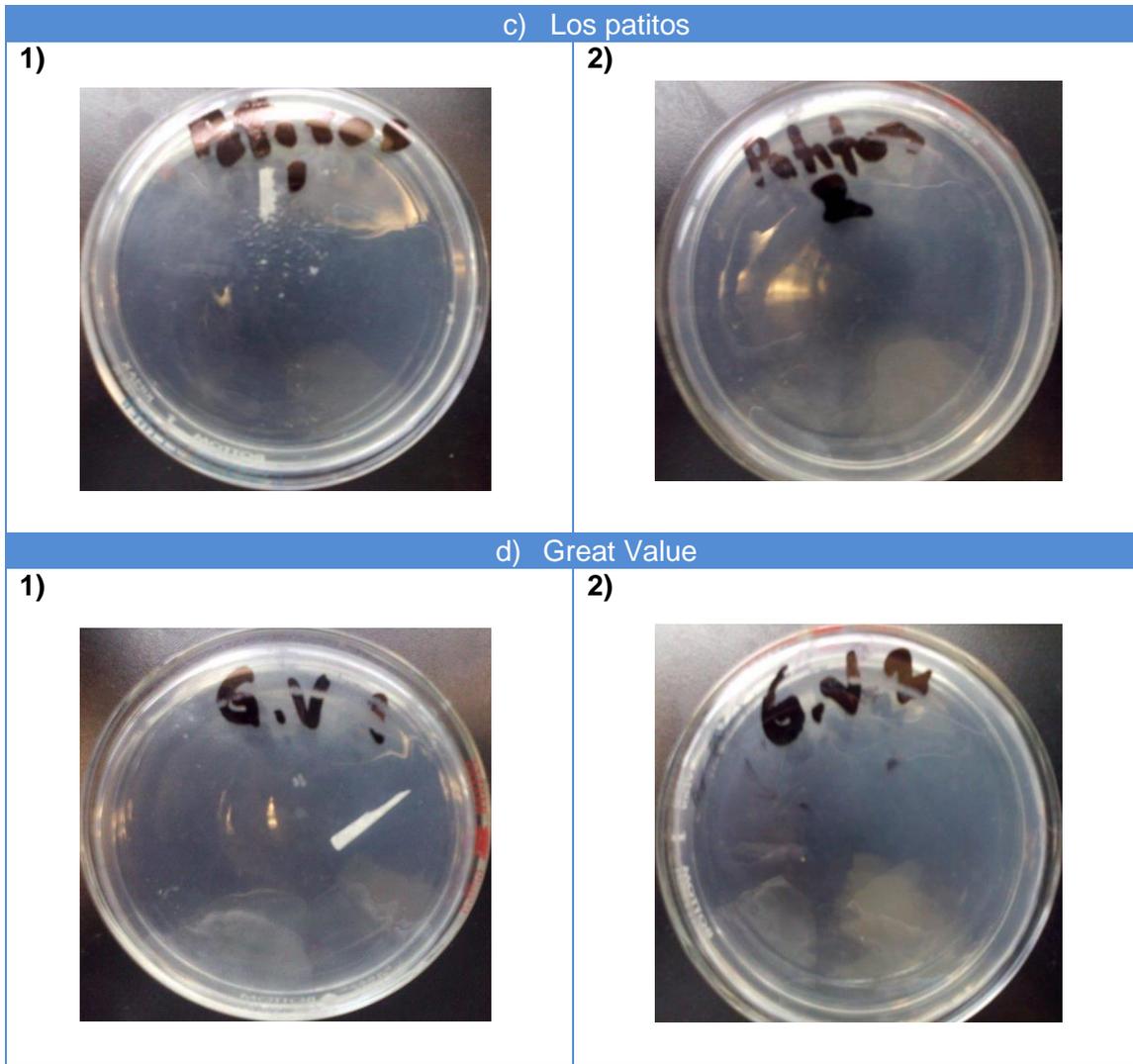


Figura 3.2 Placas de las marcas de sanitizantes que se evaluaron con la cepa de *Staphylococcus aureus* para la determinación de las células sobrevivientes: **c)** Los patitos placa No.1 sin crecimiento, placa No.2 sin crecimiento **d)** Great Value placa No.1 con crecimiento, placa No.2 con crecimiento