

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**DETERMINACION COMPARATIVA DE COEFICIENTE FENOLICO
DE COMPUESTOS CLORADOS Y YODADOS,
USANDO COMO ORGANISMOS DE PRUEBA
SALMONELLA TYPHOSA Y STAPHYLOCOCCUS AUREUS.**

TESIS

Que presenta

FLORENCIA BONNET ROMERO

para obtener el título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

México, D. F.

1962



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.

A MIS PADRES.

Con agradecimiento y cariño.

A MIS HERMANOS.

A MIS MAESTROS.

**A LA UNIVERSIDAD
FEMENINA DE MEXICO.**

A LA SEÑORA
ADELA FORMOSO VDA. DE OBREGON SANTACILIA.

A la Sra. Q.F.B.

M. PILAR R. DE BELAUSTEGUIGOITIA

por la realización de este trabajo.

Al Sr. Ing. Quim.

ANDRONICO GONZALEZ MORENO

por su ayuda técnica.

Con profundo agradecimiento a
U. S. SANITARY DE MEXICO, S. A.
en cuyos laboratorios realicé la parte práctica
de este trabajo.

S U M A R I O

I. Introducción.

- . Desinfección y desinfectantes.
- . Mecanismo de acción de los germicidas.
- . Reversión de la acción antibacteriana.
- . Evaluación de germicidas.

II. Material.

a) Organismos de prueba:

- . Caracteres morfológicos.
- . Caracteres fisiológicos.
- . Habitat.
- . Cultivo.

b) Reactivos:

- . 4 y 6 cloro 2. fenil fenol.—Descripción.—Propiedades físicas.—Propiedades antisépticas y germicidas.
- . Mezcla de yodo y surfactante no-iónico.—Descripción.—Propiedades físicas.—Propiedades antisépticas y germicidas.
- . 2,2'-Metileno bis (3, 4, 6, triclora fenol) (Hexaclorofeno).—Descripción.—Propiedades físicas. — Propiedades antisépticas y germicidas.
- . Fenol.

c) Aparatos.

III. Método.

- . Técnica del Servicio de Alimentos y Drogas (Food & Drug Administration).

IV. Resultados.

V. Referencias bibliográficas.

SUMARIO

- I. Introducción.
 - . Desinfección y desinfectantes.
 - . Mecanismo de acción de los germicidas.
 - . Reversión de la acción antibacteriana.
 - . Evaluación de germicidas.
- II. Material.
 - a) Organismos de prueba:
 - . Caracteres morfológicos.
 - . Caracteres fisiológicos.
 - . Habitat.
 - . Cultivo.
 - b) Reactivos:
 - . 4 y 6 cloro 2. fenil fenol.—Descripción.—Propiedades físicas.—Propiedades antisépticas y germicidas.
 - . Mezcla de yodo y surfactante no-iónico.—Descripción.—Propiedades físicas.—Propiedades antisépticas y germicidas.
 - . 2,2'-Metileno bis (3, 4, 6, triclora fenol) (Hexaclorofeno).—Descripción.—Propiedades físicas.—Propiedades antisépticas y germicidas.
 - . Fenol.
 - c) Aparatos.
- III. Método.
 - . Técnica del Servicio de Alimentos y Drogas (Food & Drug Administration).
- IV. Resultados.
- V. Referencias bibliográficas.

I. INTRODUCCION

Desinfección y desinfectantes. (9).

Se da el nombre de desinfección a la destrucción de bacterias mediante productos químicos. En la descripción del proceso se emplean diversos términos: germicida, bactericida, antiséptico, desinfectante, viricida, agente bacteriostático y esterilización.

Se entiende por germicida a los agentes que destruyen bacterias, pero no esporas, sean estas patógenas o no.

Bactericida es sinónimo de germicida, aunque debe limitarse en rigor al exterminio de bacterias.

Antiséptico. Esta palabra tiene varias acepciones, ya que mientras unos la identifican como bactericida y germicida, otros aplican el término a los agentes que paralizan la acción bacteriana, ya sea destruyendo a los microorganismos, o bien impidiendo su desarrollo y reproducción.

De acuerdo con esos conceptos un germicida puede ser considerado como antiséptico, según la concentración de la solución, la persistencia de su acción y la naturaleza del microorganismo. Así, un germicida muy diluido puede inhibir solamente el desarrollo y multiplicación de las bacterias, y un agente que los mate en un lapso determinado, tal vez no pase de impedir su crecimiento si el tiempo de exposición se abrevia; en el primer caso se clasificará como germicida, y como antiséptico, en el segundo. Algunos gérmenes son menos resistentes que otros a los agentes tóxicos, lo cual significa que una sustancia puede ser germicida frente a un microorganismo y antiséptico respecto a otro distinto.

Un desinfectante es un agente destructor de bacterias patógenas y otros microorganismos nocivos, excepto esporas.

El término viricida se aplica a cualquier agente que sea capaz de destruir o inhibir virus.

Churchman (1912, 1928), en sus estudios sobre colorantes observó que cierta concentración de ellos no mataba a los gérmenes, sino que

mantenía en suspenso sus funciones vitales, de tal suerte que al aumentar la dilución de la mezcla de bacteria y colorante, se reanuda el desarrollo de aquélos. Los colorantes recibieron el nombre de agentes bacteriostáticos, y el fenómeno, bacteriostasis. Otros compuestos de mercurio y plata, sin ser colorantes muestran igual propiedad, por lo cual, a todo aquel compuesto que muestre tales características se le denomina agente bacteriostático.

Esterilización es el proceso mediante el cual se destruye completamente a todos los microorganismos presentes, inclusive a las esporas.

El proceso de la desinfección no es repentino, sino gradual, ya que el número de gérmenes destruidos en la unidad de tiempo es mayor al principio, y va disminuyendo paulatinamente al avanzar el tiempo de exposición. Así, utilizando diversos agentes, cuanto mayor sea el número de bacterias presentes, más tiempo se requerirá para matarlas. Supóngase que una suspensión contiene 200 000 microorganismos por milímetro cúbico, y que un 90% de ellas se destruyen cada minuto; el número de bacterias que mueren en un minuto y el tiempo empleado para destruirlas totalmente será:

Tiempo de acción del germicida.	No. de bacterias muertas por mm ³	No. de bacterias vivas por mm ³ .
0 min.	—	200 000
1 min.	180 000	20 000
2 min.	18 000	2 000
3 min.	1 800	200
4 min.	180	20
5 min.	18	2
6 min.	1.8	0.2
7 min.	0.18	0.02

La cifra 0.02 significa que quedan dos bacterias vivas en 100 ml de suspensión de caldo, al cabo de 7 minutos.

Mecanismo de acción de los germicidas

Rara vez se puede clasificar a un agente antibacteriano por su modo particular de acción, ya que la mayoría de las veces este es desconocido, debido principalmente a su diversidad y complejidad. Sin embargo, pueden hacerse algunas generalizaciones. A altas concentraciones muchas sustancias son tan destructivas, que precipitan las proteínas celulares. En ciertas condiciones algunos agentes pueden romper la membrana celular. La mayor parte de las enzimas esenciales de la célula bacteriana poseen grupos sulfhidrilo ($-SH$) y únicamente pueden funcionar si permanecen dichos grupos libres y reducidos; de ahí, que los agentes

que oxidan los grupos $-SH$, o se combinan con ellos, son fuertes inhibidores bacterianos. Finalmente, muchos agentes pueden actuar interfiriendo una o más reacciones enzimáticas específicas. El bloqueo de dichas reacciones recibe el nombre de *antagonismo químico*. (6).

Por lo que se refiere a la precipitación o coagulación de las proteínas, se puede decir que todas las enzimas celulares están representadas por dichos compuestos, los cuales se encuentran en estado coloidal disperso. Dicha coagulación tiene lugar en dos etapas: en la primera (acción del agente antibacteriano) se produce un cambio en la disposición de las cadenas de péptidos, de tal modo que la proteína ya no es tan soluble en su punto isoeléctrico como lo era primitivamente, se digiere más fácilmente por los fermentos proteolíticos y pierde sus propiedades enzimáticas si se trata de una proteína-fermento. Dicho cambio recibe el nombre de desnaturalización. La segunda etapa es la precipitación de la proteína desnaturalizada insoluble, reduciéndose el proceso probablemente a una simple coagulación de coloides en general.

Entre este grupo de germicidas se encuentran el fenol, alcohol y ion mercúrico.

La pared celular actúa como una membrana selectiva, dejando pasar algunos solutos a través de ella y excluyendo a otros. Los mecanismos involucrados en el transporte activo de dichas sustancias por la membrana y su concentración dentro de la célula, no se conocen con exactitud, pero se sabe que solamente pueden penetrar a la célula cuando la membrana está intacta. Por ello, cuando algunos compuestos (germicidas) se concentran en la superficie celular, alteran las propiedades físicas y químicas de la membrana, impidiendo su función normal, matando o inhibiendo en esta forma a la célula bacteriana.

Además de ello, la membrana celular es también una estructura de sujeción, protegiendo a la célula contra la lisis osmótica. Así, los agentes que destruyen a la pared celular (por ejemplo, la lisozima) o impiden su síntesis normal (por ejemplo, la penicilina) traen consigo la lisis de la célula. (Esta acción de la penicilina únicamente se ha observado en cultivos *in vitro*).

Las enzimas proteolíticas que contienen cisteína, poseen cadenas laterales que terminan en un grupo sulfhidrilo ($-SH$); además, cuando menos una coenzima fundamental (la coenzima requerida para la transferencia del grupo acilo) contiene un grupo $-SH$ libre y reducido. Todos aquellos agentes que se combinan u oxidan el grupo $-SH$, interfieren en el metabolismo, ligando los grupos $-SH$ vecinos, para dar uniones disulfuro: (6)



Muchos metales como el ion mercúrico (Hg^{++}) interfieren en el metabolismo bacteriano, debido a que se combinan con los sulfhidrilos de algunas enzimas: (6)



En este mismo caso se encuentran los metales pesados. Probablemente la razón exacta para el requerimiento de grupos —SH libres y reducidos no se conozca con certeza, aunque en algunos casos (por ejemplo, la coenzima II) representa el sitio de unión normal con el sustrato.

La interferencia en la reacción entre una enzima específica y su sustrato normal por un agente químico se conoce con el nombre de antagonismo químico. Esta interferencia puede radicar en la combinación del antagonista con alguna parte de la coenzima (ya sea con la apoenzima proteica, con el activador mineral o con la coenzima) impidiendo en esta forma la acción específica sobre el sustrato correspondiente. Es importante hacer notar, que una enzima se combina con el antagonista por la similitud que presenta este con respecto al sustrato esencial, siempre y cuando la afinidad entre la enzima y el "análogo" sea lo suficientemente grande como para desplazar a dicho sustrato.

Muchas holoenzimas tienen una unión mineral que actúa como puente, ya sea entre la enzima y la coenzima, o bien entre la enzima y el sustrato. Existen algunas sustancias químicas que se combinan rápidamente con estos minerales impidiendo la unión de la coenzima o del sustrato normal. Por ejemplo, el Cd y el cianuro (CN^-) se combinan con el átomo de hierro de las enzimas que contienen porfirina impidiendo su función en la respiración. De la misma forma que las enzimas, los antagonistas también son activos a bajas concentraciones.

Reversión de la acción antibacteriana

La acción de los agentes antibacterianos es reversible en la mayor parte de los casos. Esta reversibilidad se puede lograr de varias maneras:

- a) *Remoción del agente* — Consiste en separar las bacterias del agente antibacteriano lavándolas perfectamente en la centrifuga y resuspendiéndolas en un medio de cultivo fresco. Después de este tratamiento las bacterias pueden reanudar su multiplicación normal.
- b) *Reversibilidad por sustrato* — Cuando un antagonista químico del tipo "análogo" forma un complejo disociable con la enzima, es posible desplazarlo mediante una concentración elevada de sustrato normal, en cuyo caso recibe el nombre de "inhibición competitiva". La relación que existe entre la concen-

tración del inhibidor y la concentración del sustrato que revierte la inhibición recibe el nombre de índice antibacteriano, el cual por lo general es muy alto (110 a 10.000), lo que indica una afinidad mayor de la enzima por el sustrato normal.

- c) *Inactivación del agente.*—Es frecuente que se impida la acción de un agente antibacteriano por la adición al medio de una sustancia que se combine con él, impidiendo así su acción sobre los constituyentes celulares. Así, por ejemplo, el ion mercuríco puede ser inactivado por la adición al medio de compuestos con sulfhidrilo, tales como el ácido tioglicólico.
- d) *Protección contra la lisis.*—Puede impedirse la lisis bacteriana haciendo el medio isotónico para los protoplastos bacterianos, para lo cual se requieren concentraciones de 10 a 20% de sacarosa; en tales condiciones, los protoplastos inducidos por la penicilina permanecen viables y crecen dando lugar a células normales cuando se suprime la penicilina. (6)

Evaluación de germicidas.

El método que generalmente se emplea para valorar un germicida se basa en su coeficiente de fenol, aunque actualmente se han propuesto otros métodos nuevos para medir la toxicidad frente a tejidos y frente a bacterias de ensayo. Puede definirse el coeficiente fenólico como un número que expresa la relación entre la eficacia germicida de un desinfectante y la eficacia del fenol, en idénticas circunstancias. (9)

Existen tres métodos para la determinación del coeficiente fenólico: el Método del Hygienic Laboratory (H-L), el Método de Rideal-Walker (R-W) y el Método del Servicio de Alimentos y Drogas (Food & Drug Administration, F.D.A.). (9)

El H-L (por comodidad se abreviará así el método del Hygienic Laboratory) y el R-W son los más antiguos, y por ende los primeros que fueron usados, aunque en trabajos de rutina suelen obtenerse resultados no del todo exactos, dando lugar a errores más o menos considerables. En vista de tales inconvenientes, Loyd P. Shippen, bacteriólogo del Insecticide and Fungicide Board, después de haber llevado a cabo gran número de pruebas, señaló un nuevo método para efectuar el coeficiente fenólico, basado en los dos métodos ya existentes. La eficacia y exactitud de este nuevo método fué comprobado por más de 15 años en trabajos de rutina para evaluar los germicidas del Servicio de Alimentos y Drogas, razón por la cual dicha técnica tomó el nombre de F.D.A., aunque años más tarde, George F. Reddish, sucesor del Dr. Shippen publicó esta técnica con el nombre de "Rideal-Walker modificado", siendo válido en la actualidad cualquiera de las dos denominaciones. (10)

Las diferencias entre los tres métodos se encuentran resumidos en el siguiente cuadro:

DIFERENCIA ENTRE LOS 3 METODOS PARA DETERMINAR EL COEFICIENTE FENOLICO(10)

SINONIMIA	METODO F.D.A.	METODO R-W	METODO H-L
Composición del medio de cultivo	Peptona 10 g Extracto carne 5 g Sal 5 g Agua c.b.p. ... 1,000 ml Hervir 20 min.	Peptona 20 g Extracto carne 10 g Sal 10 g Agua c.b.p. ... 1,000 ml Hervir 30 min.	Peptona 10 g Extracto carne 3 g Sal 5 g Agua c.b.p. ... 1,000 ml Hervir 15 min.
Acidez del medio	pH 6.8	pH: Aprox. 1.5 (no definido).	No se ajusta el pH, sin embargo, éste varía entre 6-7
Contenido del medio de cultivo en cada tubo	10 ml	5 ml	10 ml
Cantidad de cultivo agregado al desinfectante	0.5 ml — 5.0 ml	0.5 ml — 5.0 ml	0.1 ml — 5.0 ml
Microorganismo de prueba	<u>Staphylococcus aureus:</u> Salmonella typhosa (2)	Salmonella typhosa (2)	Salmonella typhosa. (2)
Dilución de fenol que mata al germen en 10 minutos, pero no en 5 min.	1:90	1:90 — 1:100	No se han establecido límites.
Condición del tubo de prueba	Tapado con algodón	Tapado con algodón	Abiertos
Temperatura del ensayo	20°C.	15-18°C.	20°C.
Intervalos de tiempo en la prueba	5, 10 y 15 minutos	2.5, 5, 7.5 y 10 minutos	5, 7.5, 10, 12.5 y 15 min.
Cálculo del coeficiente fenólico	La mayor dilución que mata a los gérmenes en 10 minutos entre la dilución del fenol que tenga el mismo efecto.	La mayor dilución que mata a los gérmenes en 7.5 minutos, entre la dilución del fenol que tenga el mismo efecto.	La mitad de la mayor dilución que no muestre crecimiento en 5, 10 y 15 min. dividida entre la dilución de fenol que tenga el mismo efecto.

Los resultados que se obtienen al probar un germicida por el método F.D.A., que previamente ha sido evaluado por el método H-L y R-W, son prácticamente iguales. Así, los coeficientes fenólicos de un gran número de sustancias químicamente relacionadas con el fenol (el único tipo de desinfectantes para los cuales se acepta el método H-L) son, en la mayoría de los casos similares, ya sea por el método H-L o por el F.D.A. Estos resultados han sido confirmados por cinco laboratorios de gran prestigio. Al comparar el método F.D.A. con el R-W, se obtienen, como en el caso anterior, resultados análogos, aunque los coeficientes fenólicos obtenidos siguiendo la técnica F.D.A. en compuestos derivados del alquitrán de hulla, siempre son más bajos que los obtenidos por la técnica de Rideal-Walker, siendo importante aclarar que estos resultados altos generalmente son erróneos, debido a que en dicha técnica se emplea un medio de cultivo poco adecuado para el crecimiento óptimo del organismo de prueba, de ahí, que los resultados negativos no representen siempre el hecho de que el germen ha muerto por la acción del germicida, sino que también es posible que el microorganismo no se haya desarrollado porque el medio no es conveniente, y no por la acción misma del bactericida. (10)

Tomando en cuenta las diferencias anotadas en el cuadro anterior y la considerable reducción de manipulaciones, tiempo y material, el método más valioso es el F.D.A., sobre todo en trabajos de rutina.

Entre las ventajas que presenta el Método del Servicio de Alimentos y Drogas se encuentran:

- 1.—El medio de cultivo es el adecuado para favorecer el desarrollo bacteriano, tanto en lo que se refiere a pH, como a cantidad de materia orgánica.
- 2.—La técnica no está restringida al empleo de un solo microorganismo de prueba, como en el caso de los métodos H-L y R-W (*Salmonella typhosa*), pudiendo ser usados, además de *Salmonella typhosa* y *Staphylococcus aureus*, otros como: *Corynebacterium diphtheriae* (avirulenta), *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella paratyphi A* *Shigella dysenteriae* (Flexner), *Streptococcus hemolyticus* (Lancefield Grupo A), *Neisseria gonorrhoeae* y *Bacterium ammoniagens*.

Es importante hacer notar que las cepas de *Salmonella typhosa* y *Staphylococcus aureus*, los principales microorganismos empleados en esta prueba, permanecen lo suficientemente constantes en su resistencia al fenol, siempre y cuando se encuentren en un medio ajustado, por lo que solo se necesita practicar un solo control de fenol, aunque frecuentemente suele hacerse una segunda prueba adicional con el objeto de comprobación. Esto permite 9 diluciones del desconocido con 30 segundos de intervalo entre cada transferencia, o 14 tubos cuando dicho intervalo es de 20 segundos

II. MATERIAL

a) Organismos de prueba.

Staphylococcus aureus. (2)

Grupo: cocos piógenos.

Familia: Micrococaceae.

Habitat: Por lo regular se encuentran en la piel, membranas, mucosas, polvo, aire, esputo y pus. (3)

Caracteres morfológicos. Los estafilococos son células esféricas (cocos) de 0.8 a 1 micra de diámetro, que generalmente se encuentran agrupadas en racimos irregulares, solos, en pares o bien en pequeñas cadenas. El frote practicado con una muestra de pus revela todas estas agrupaciones, mientras que los frote obtenidos de un cultivo de agar presentan preferentemente la agrupación en racimos. Cuando los frote se llevan a cabo a partir de cultivos en caldo nutritivo, se presentan las células aisladas y dispersas. (3)

Por lo que toca a sus propiedades tintoriales se puede decir que se tiñen rápidamente con los colorantes de anilina. Son Gram-positivos. No móviles, no esporulados y no capsulados.

Cultivo. Crecen bien en agar nutritivo o gelosa sangre, no requiriendo por tanto medios muy enriquecidos. En gelosa nutritiva forman colonias más o menos de 2 mm de diámetro; son opacas, de bordes completos, de color amarillo naranja, fácilmente emulsionables con solución salina isotónica estéril. En caldo nutritivo crecen con formación de velo y sedimento.

Caracteres fisiológicos. (3) Temperatura óptima: 37°C. Son aerobios o anaerobios facultativos. Reducen los nitratos a nitritos. Fermentan la dextrosa, lactosa, sacarosa, maltosa, manitol y glicerina con producción de ácido pero no de gas. No fermentan la rafinosa e inulina. Producen lentamente ácido sulfhídrico. La formación del pigmento amarillo tiene lugar a 22 C en un medio que contiene albúmina. Son resistentes a la sequedad durante varios meses. También resisten a la penicilina por producir un fermento que la destruye: la penicilinasa. El punto térmico letal varía según las cepas entre 10 minutos a 60°C y 30 minutos a 80°C. Productos tóxicos. Se han observado los efectos de varias toxinas solubles producidas por Staphylococcus aureus y algunos otros microorga-

nismos patógenos. Entre ellos se distinguen dos grupos de sustancias: las exotoxinas y las endotoxinas. Entre las principales exotoxinas (filtrables y que se descomponen por el calor) se encuentran las siguientes:

Hemolisina. produce la hemólisis de los glóbulos rojos. Es producida, pero en menor concentración por otros microorganismos patógenos, y menos frecuentemente por especies saprófitas. La hemolisina es inactivada por calentamiento a 60 C. por dos minutos. La inyección subcutánea de tal toxina a conejos trae como consecuencia la producción de antistafiloheolisina.

Leucocidina. Causa la lisis de los leucocitos. Esta lisina es producida por Staphylococcus aureus tanto in vivo como in vitro (esto es, tanto en el organismo animal como en los medios de cultivo).

Toxina letal (toxina tisular). Produce la muerte en animales cuando se inyecta por vía intravenosa.

Toxina dermonecrótica. Produce necrosis cuando se inyecta por vía intradérmica en animales.

Enterotoxina. Causa gastroenteritis aguda (veneno ingerible) cuando se toma con los alimentos.

Fibrinolisisina. Disuelve o digiere el fibrinógeno humano.

Coagulasa. Produce la coagulación del suero citratado.

Salmonella typhosa. (2)

Grupo: tífico.

Familia: Enterobacteriaceae.

Habitat: Heces de personas con fiebre de tifóidea o portadores del microorganismo. (3)

Caracteres morfológicos. Las salmonelas son células en forma de pequeños bastones, generalmente rectos (bacilos) de 0.6 a 0.7 micras de ancho por 2-3 micras de largo. Generalmente se presentan solos, en pares y ocasionalmente en cadenas cortas. Se tiñen fácilmente con los colorantes ordinarios de anilina. Son Gram-negativos. Se mueven mediante 12 flagelos peritricos. No forman esporas. Carecen de cápsula.

Cultivo. Crecen bien en agar nutritivo, gelatina, caldo nutritivo, medio de papa, medio de Endo, agar-verde brillante, medios que contengan selenito o tiosulfato de sodio, medio de Wilson-Blair. En gelosa se desarrollan colonias amarillentas, muy pálidas, pequeñas y con bordes completos. En caldo nutritivo únicamente se observa sedimento.

Caracteres fisiológicos. Temperatura óptima: 37 °C. a 40 °C. se obtiene un desarrollo pobre y a temperaturas por arriba de 40 °C. no crecen. Son

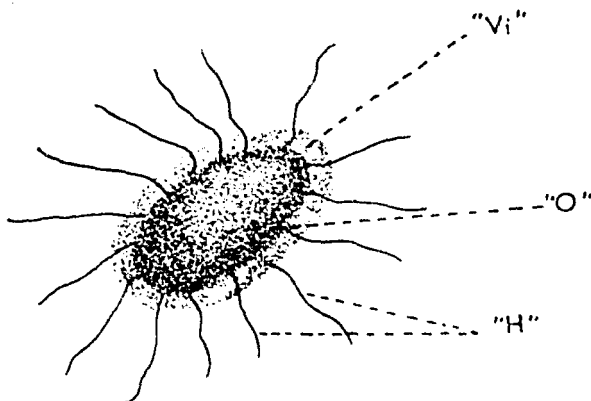
aerobios y anaerobios facultativos. Reducen los nitratos a nitritos. Producen ácido sulfhídrico. No forman indol. En la fermentación de dextrosa, levulosa, galactosa, maltosa, rafinosa, dextrina, glicerina y manitol se produce únicamente ácido. No fermentan la lactosa, sacarosa, inulina, ramosa, inositol y salicin. (3)

El germen puede cultivarse durante bastante tiempo en medios artificiales. Se destruye a una temperatura de 56°C en 20 minutos, por una solución de fenol al 5%, o por una solución de cloruro mercuríco 1:500 en 5 minutos. (3)

Estructura antigénica. (6) Existen tres antígenos principales:

- 1.—Antígenos "H" o flagelares, los cuales se inactivan por calentamiento a temperaturas superiores a 60°C, así como por el alcohol y los ácidos. Para determinaciones serológicas, se les prepara añadiendo formol a cultivos jóvenes que contienen salmonelas móviles en caldo. Tales antígenos se aglutinan rápidamente con sueros que contengan anticuerpos anti "H", formando grandes masas esponjosas. Los antígenos "H" contienen varios constituyentes inmunológicos: para una misma especie de salmonelas los antígenos flagelares pueden presentarse en cualquiera de dos formas o en ambas, llamadas Fase 1 y Fase 2. La Fase 1 es compartida solamente por unas cuantas especies diferentes, en tanto que la Fase 2 lo es por muchas. Los organismos tienden a mutar de una fase a otra, llamándose a éste fenómeno mutación de fase.
- 2.—Los antígenos "O" o somáticos, que se presentan en la superficie del soma bacteriano, tanto en las formas móviles como en las inmóviles son resistentes al calentamiento prolongado a 100°C., al alcohol y a los ácidos diluidos. Los antígenos "O" se preparan a partir de bacilos inmóviles o por tratamiento con calor y alcohol. Estos antígenos se aglutinan lentamente con sueros que contengan anticuerpos anti "O". Son lipopolisacáridos y están libres de proteínas.
- 3.—El antígeno "Vi", presente en la parte periférica del soma bacteriano, a menudo interfiere con la aglutinación de las cepas recientemente aisladas por antisueros que contienen principalmente aglutinógenos anti "O". Es destruido por calentamiento durante una hora 60 C. así como por los ácidos y el fenol. Los cultivos que poseen el antígeno "Vi" tienden a ser más virulentos para los ratones que aquellos que carecen de él.

Variaciones. Los organismos pueden perder antígenos "H" y devenir en inmóviles: la pérdida de antígenos "O" está asociado con el cambio de morfología de lisa a rugosa. El antígeno "Vi" puede perderse parcial o totalmente. Los antígenos pueden ser adquiridos o perdidos mediante el proceso de transducción.



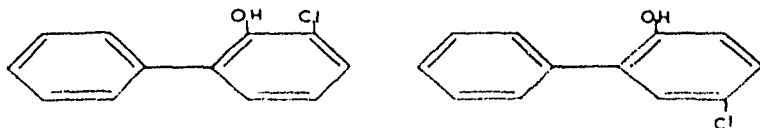
ESTRUCTURA ANTIGENICA DE SALMONELLA TYPHOSA (6)

Toxinas. Después de la muerte de la célula, en la autólisis, se liberan los antígenos somáticos del cuerpo bacteriano; tales son las endotoxinas, compuestos de complejos polisacáridos-lípido-proteína. Son termoestables y provocan una marcada respuesta febril en el hombre y en los animales cuando se administra endovenosamente (por ejemplo, la bacteremia tífica durante la piroterapia.) Cantidades grandes pueden provocar congestión, hemorragias y necrosis de diversos órganos, fundamentalmente debido a las lesiones provocadas en endotelio vascular. (6)

b) Reactivos.

. 4 y 6 cloro 2. fenil fenil.

Fórmula:



Peso molecular: 204.6.

Descripción: líquido viscoso claro o color paja.

Densidad: 1.234 a 25/25°C.
1.239 a 25/25°C.

Índice de refracción: a 25°C. 1.629.

Solubilidad aproximada:

g por 100 g de solvente a 25°C.

Acetona	Completamente miscible
Aceite de soya	Completamente miscible
Aceite de linaza	Completamente miscible
Aceite de pino	Completamente miscible
Alcohol etilico	Completamente miscible
Alcohol isopropilico	Completamente miscible
Benceno	Completamente miscible
Etilen glicol	Completamente miscible
Metanol	Completamente miscible
Tolueno	Completamente miscible
Trementina	Completamente miscible
Agua	Completamente miscible menos de 0.1 g

Por lo que toca a su almacenamiento se puede decir que siempre debe conservarse a temperaturas de 15-16°C. o más.

Posee propiedades bactericidas, por lo cual se emplea como desinfectante.

Mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Composición. Este compuesto es un complejo concentrado de yodo y surfactante no iónico que contiene un 20% de yodo disponible, el cual se usa para las fórmulas de productos para la limpieza que a la vez son detergentes, enjuagues germicidas o limpiadores y productos similares, exterminadores de bacterias y microorganismos, los cuales generalmente contienen de 0.3 a 2% de yodo libre.

Este compuesto pertenece a los nuevos productos químicos germicidas denominados yodoforos (literalmente la palabra "yodofor" quiere decir "vehículo del yodo"; del latín: iodum: yodo y del griego pherein: llevar.), o lo que es lo mismo, una mezcla de yodo y un vehículo que aumenta enormemente la solubilidad de producto, estabilizando al yodo en sistemas acuosos. (7)

Yodo disponible	20%
Surfactante no iónico	72% Nonilfenoxi polietileno etanol (aprox.)

Propiedades físicas:

Aspecto: líquido que se puede verter, de color moreno oscuro.

Densidad: a 25°C. 1.34.

Punto de solidificación: 5.2°C. (41.3°F).

pH de una solución acuosa al 10%: 1.5 a 2.0 (el pH tiende hacia la porción neutra).

Viscosidad (cps):

15°C	4 000
20°C	2 000
25°C	1 700
30°C	1 250

Envase: Tanques de acero, de cabeza cerrada, forrado de Unichrome, polietileno, etc.

Almacenaje: Como sucede con otras soluciones de yodo, se deben tomar precauciones para evitar que se contamine con materia orgánica. Debe procurarse que el almacenaje sea corto, tomando como límite máximo de tiempo seis meses.

Precauciones: Aunque es ligeramente irritante para la piel y los ojos debe evitarse todo contacto, y en caso de que esto suceda, lavar abundantemente con agua. **NO DEBE ADMINISTRARSE POR LA VIA INTERNA.** (7)

Propiedades germicidas. La actividad germicida del yodo se pone de manifiesto a un pH de 4 o más bajo, siendo suficiente un breve contacto para matar a una serie de microorganismos como: Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aureus, Salmonella typhosa; virus, tales como el de la poliomielitis paralítica; hongos; protozoarios y algas. Es importante hacer notar que esta actividad germicida no disminuye en presencia de agua dura.

El vehículo no-iónico (surfactante), posee propiedades de detergente; por su carácter de humectante de superficies, promueve la penetración del yodo en las áreas donde se necesita. Por su solubilidad en agua, este producto se enjuaga fácilmente, impidiendo al mismo tiempo que se manche la piel, telas, superficies duras, etc.. Su carácter no-iónico lo hace compatible con una gran cantidad de surfactantes catiónicos, aniónicos y no-iónicos.

Las propiedades detergentes y germicidas de esta mezcla de yodo y vehículo, o cualquier compuesto que lleve tal producto, dependen de la concentración del halógeno disponible (o sea aquella porción total de yodo presente, que es germicidamente activo) y de la cantidad de surfactante que está presente en la correspondiente dilución para el uso final a que se destina.

Aplicaciones. Los productos hechos con este yodoform se formulan de manera que contengan ácido, agua, 0.5% de yodo disponible y, frecuentemente un surfactante no-iónico adicional.

El yodo exhibe su plena actividad germicida en soluciones ácidas; en medio alcalino, el yodo libre se disipa en compuestos no germicidas, por lo cual debe procurarse una cantidad suficiente de ácido para mantener un pH de 4 ó más bajo en la dilución final. Frecuentemente se emplea ácido fosfórico, pero pueden utilizarse otros.

Es aconsejable tener un exceso de yodo disponible de aproximadamente 100% sobre lo que se indica en la etiqueta, como margen de seguridad por una posible pérdida de yodo disponible, cuando se conserva la dilución por un tiempo prolongado. (7)

Valoración. El yodo disponible se puede valorar por tres métodos, a saber:

- a) Técnica visual. La intensidad de las soluciones claras color ámbar disminuye al disminuir el yodo disponible. Esta propiedad del producto es muy valiosa para una estimación visual rápida de la potencia de las diluciones que se usan.
- b) Análisis volumétrico-potenciométrico. Este método es el que se recomienda para determinar con exactitud el yodo disponible, pudiendo ser usado tanto en diluciones como en fórmulas concentradas.

El yodo disponible se define como el material que es analizable volumétricamente por razón de su capacidad para oxidar el tiosulfato de sodio.

El ensayo se efectúa por análisis volumétrico-potenciométrico, más que por el análisis volumétrico convencional del "punto final del almidón", porque la presencia del surfactante no-iónico interfiere con el punto final del almidón. Un medidor ordinario de pH con una escala Multivot puede servir de potenciómetro.

Técnica. Pese aproximadamente una muestra de 1g corriéndolo hasta el próximo miligramo y disuélvala en aproximadamente 100 ml de agua destilada. Esta cantidad es satisfactoria para probar el yodofor; dará una cantidad suficiente de yodo disponible para consumir más o menos de 15-20 ml de una solución 0.1N de tiosulfato de sodio. Para determinar el contenido de yodo disponible de las soluciones diluidas del yodo-surfactante no-iónico, multiplique esta cantidad (1g) por el factor de dilución.

Analice la solución volumétrica-potenciométrica con la solución tipo de tiosulfato de sodio 0.1N, usando un electrodo de platino vs calomel.

Cálculo:

$$\% \text{ de yodo disponible} = \frac{\text{ml Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ normal} \times 12.692}{\text{g de muestra}}$$

Para el contenido total de yodo: yodo disponible-yoduro.

- c) Método de Volhard. (8) Pese aproximadamente 1g de muestra y disuélvala en aproximadamente en 100 ml de agua destilada. Esta cantidad de yodofor consume aproximadamente de 15-20 ml de una solución 0.1N de nitrato de plata. Cuando las pruebe, diluya las soluciones de la mezcla yodo-surfactante no iónico y multiplique esta cantidad (1g) por el factor de dilución.

Añada goteando la solución 1M de bisulfito de sodio hasta que el color del yodo haya desaparecido completamente. Analice volumétricamente con solución de nitrato de plata 0.1N hasta que ya no se forme precipitado y agregue 5 ml más. Adicione 10 ml de ácido nítrico concentrado y más o menos 10 ml de la solución indicadora de alumbre férrico y vuelva a analizar volumétricamente con sulfocianuro de amonio 0.1N, hasta lograr obtener el característico punto final rojizo.

Cálculos:

ml. netos de 0.1N Ag NO₃ = ml Ag NO₃ - ml de NH₄ SCN.

% total de Yoduro = $\frac{\text{ml. netos de AgNO}_3 \times \text{AgNO}_3 \text{ normal} \times 12.692}{\text{g. de muestra}}$

NOTA:—Este compuesto recibe el nombre comercial de AntaroX (7)
VRO—20.

. 22'-metileno bis (3,4,6 tricloro fenol).

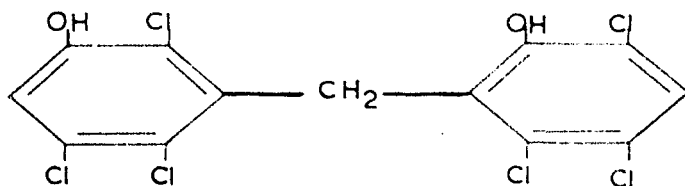
Nombres quimicos y comerciales. El hexaclorofeno llamado comúnmente "G-11" (Nombre propuesto por Council as Pharmacy and Chemistry of the American Medical Association) es un compuesto que pertenece a los bis fenoles clorados. Quimicamente hablando el hexaclorofeno puede ser nombrado de diferentes formas:

. bis (3,5,6, tricloro, 2, hidroxí fenil) metano.

. 2,2'-metileno bis (3,4,6, tricloro fenol)

. 2,2'-dihidroxí, 3,5,6,3',5',6' hexacloro difenil metano. (11) (12)

Preparación. Se prepara por la condensación de dos moléculas de 2,4,5 tricloro fenol con una molécula de formaldehído en presencia de ácido sulfúrico concentrado, manteniendo baja la temperatura:



Propiedades físicas. (11) (12)

Apariencia

Polvo blanco volátil

Punto de fusión

160/5°C. mínimo

Olor

Carece de olor

Solubilidad

(g en 100 ml de solvente a 25°C.)

Alcohol etílico

50

Acetona

191

Benceno

9.3

Tolueno

5.6

Propilén glicol

24.5

Miristato-palmitato de isopropilo

20

Soluble en aceites vegetales y ácidos grasos con ayuda de calor. Prácticamente insoluble en agua, aceite mineral, glicerina, petrolato y parafina.

Propiedades bactericidas. Las propiedades bactericidas y antisépticas del hexaclorofeno se ponen de manifiesto tanto en el producto solo como en todos aquellos compuestos en los que se incorpora (principalmente en jabones y cosméticos). Su actividad suele ser hasta cierto punto específica, pues es más activo contra gérmenes Gram-positivos y menos efectivo contra bacterias Gram-negativas. En varios tipos de infecciones de la piel, el hexaclorofeno puede mostrar acción bactericida específica, o posiblemente bacteriostática, y ser utilizado como agente quimioterapéutico, o como preventivo en la propagación de la infección.

Por lo que toca a las aplicaciones quirúrgicas del hexaclorofeno, se puede decir que se emplea principalmente en jabones, ya sean sólidos, líquidos o en combinación con detergentes, para el lavado quirúrgico preoperatorio, reduciéndose en esta forma, además de la flora de la piel, las dermatitis producidas por el lavado rutinario de 10 min. Ha sido demostrado que reduce considerablemente la posibilidad de contaminación de la herida si el guante llega a picarse o a rasgarse accidentalmente durante la operación, siendo importante aclarar que para obtener tales efectos, el cirujano deberá lavarse antes las manos con jabón conteniendo hexaclorofeno y abstenerse del empleo del alcohol.

Actualmente se estudia la posibilidad de aumentar los efectos de este germicida para usos quirúrgicos, mediante una unión sinérgica, esto es, se refuerza su acción al combinarse con otros materiales. Se ha confirmado, por cuatro informes independientes entre sí, que una solución de hexaclorofeno con un detergente sintético es seguro, efectivo, rápido y más efectivo. En solución alcohólica con formaldehído es un magnífico agente para la esterilización en frío de los instrumentos quirúrgicos, evitando así que la acción del vapor los desafilé. Una solución similar, sin formaldehído es muy útil en la práctica dental para desinfectar en frío los instrumentos dentales.

El hexaclorofeno también se puede incorporar en jabones de tocador, los cuales presentan propiedades antisépticas y bactericidas. Es importante hacer notar que las bacterias de la piel se pueden agrupar en dos categorías: las bacterias transitorias o temporales, cuyas variaciones dependen del contacto de la piel con el medio ambiente, y las bacterias residentes o permanentes, que viven un periodo de tiempo indefinido en la piel. Las primeras constituyen la flora transitoria, en tanto que las segundas forman la flora residente de la piel. Si este jabón se emplea en forma continua y sistemática se reduce considerablemente la flora permanente, debido a que una cantidad del hexaclorofeno queda retenida químicamente sobre la piel después de que la jabonadura ha sido elimi-

nada con el agua, contrariamente a lo que sucede con los compuestos cuaternarios de amonio, que también son empleados como desinfectantes de la piel. Estos últimos forman una capa protectora sobre la misma reduciendo en esta forma el número de gérmenes patógenos y no patógenos.

También se ha usado el hexaclorofeno en cremas de rasurar, manteniendo la cara quirúrgicamente limpia, reduciendo al máximo la probabilidad de una infección de los folículos pilosos, de los rasguños o rozaduras.

De acuerdo con la teoría de que el olor desagradable del cuerpo humano se debe a la descomposición bacteriana de los productos de la transpiración, se emplea el hexaclorofeno como un desodorante muy efectivo, puesto que al reducir la flora de la piel, disminuye además de la transpiración la descomposición de la misma.

Algunos productos para bebés, tales como talcos, jabones, lociones, etc.; productos veterinarios y jabones industriales llevan entre sus componentes hexaclorofeno. (11) (12)

. Fenol.

El fenol empleado para esta prueba debe llenar los requisitos estipulados en la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. Se puede emplear una solución al 5% como patrón, siempre y cuando se guarde en un lugar relativamente fresco, bien tapado y protegido de la luz en un frasco color ambar. Esta solución al 5% debe ser estandarizada con bromo décimo normal. (1) (5)

Para ello se pesan alrededor de 5 g de fenol y se disuelven en 100 ml de agua destilada. Se toma una parte alícuota de 5 ml, llevándolos a un matraz provisto de tapón esmerilado. Añadir de 50-60 ml de una solución 0.1N de bromo, y después 5 ml de ácido clorhídrico; tapar inmediatamente el matraz y agitar repetidas veces durante media hora y dejar en reposo 15 minutos; añadir rápidamente 5 ml de una solución acuosa de yoduro de potasio (1:5), teniendo cuidado que no escapen los vapores de bromo y tápese inmediatamente; agitar bien. Destápese y lávese el tapón y el cuello del matraz con una cantidad pequeña de agua destilada; añadir 1 ml de cloroformo y agítese bien la mezcla; valórese el yodo puesto en libertad con una solución 0.1N de tiosulfato de sodio, usando solución reactivo de almidón como indicador. Se recomienda preparar un testigo con las mismas cantidades de los mismos reactivos, de la misma manera y corregir si es necesario: cada ml de solución 0.1N de bromo equivale a 0.001569 g de fenol. (5)

NOTA.—Esta técnica es la estipulada en la FARMACOPEA NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, y la empleada en la valoración de cada una de las solución patrón.

c) Aparatos.

- . Tubos de prueba. Los tubos de cultivo, subcultivo y ensaye para las diluciones son tubos ordinarios de bacteriología de 20 x 150 mm sin labio. (10)
- . Baño de agua. Para mantener la temperatura constante durante toda la determinación se requiere un baño de agua, construido en tal forma que conserve constante la temperatura por un periodo más o menos largo. Se aconseja que dicho baño posea una tapa con orificios bien espaciados para permitir la introducción de los tubos de prueba. (10)
- . Gradilla. La gradilla puede ser de cualquier estilo, inclusive ser sustituida por la tapa del baño con orificios. Puede tener dimensiones variables, que dependen del baño y del tamaño de la incubadora, siendo solo importante que los orificios estén bien espaciados para permitir la rápida y fácil manipulación durante la prueba. El modelo con cuatro hileras es conveniente ya que permite poner el tubo que contiene la dilución del germicida y los tubos de subcultivo de 5 min., 10 min. y 15 min., uno detrás de otro. (10)
- . Asa de platino. Con el extremo encorvado ligeramente para formar un anillo de unos 4 mm de diámetro interno, con una porción recta de 3.5 a 7.5 cm. pulgadas de largo. (1)

III. METODO

Generalidades.

El coeficiente fenólico es un número que expresa la relación entre la eficacia germicida de un desinfectante y la eficacia del fenol, en idénticas circunstancias. La muestra que se va a probar se diluye y se ordenan las diluciones en una serie de concentraciones decrecientes. A éstas se les añade una porción determinada del microorganismo de prueba de cultivo en caldo. Al cabo de periodos determinados (5, 10 y 15 minutos), se traslada una pequeña porción de la mezcla del desinfectante diluido y del germen de prueba a un medio de cultivo nutritivo, y se lleva a la incubadora. Si no hay reproducción de los microorganismos en el subcultivo, es indicio de que se destruyeron a las bacterias. La dilución máxima (concentración mínima) del desinfectante que mata al microorganismo en determinado tiempo, se divide entre la dilución máxima de fenol que produjo efecto germicida en el mismo tiempo. Esta relación es el coeficiente fenólico. Es importante hacer notar que dicho coeficiente no se funda en la comparación de diferentes intervalos de tiempo, sino en la comparación de diferentes concentraciones que obran en un tiempo determinado. (4)

Método del Servicio de Alimentos y Drogas (F.D.A.) o método de Rideal y Walker modificado.

Se emplean como organismos de prueba cultivos de 22-26 horas de Salmonella typhosa que ha sido incubada a 37°C en caldo nutritivo, el cual tiene la siguiente composición:

Extracto de carne (Liebig)	5 g
Cloruro de sodio Q. P.	5 g
Peptona (Amour, para uso exclusivo de germicidas)	10 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

La mezcla se calienta 20 minutos, teniendo cuidado de ajustar después el volumen a 1000 ml. Finalmente, el pH se lleva a 6.8 empleando una solución de hidróxido de sodio. Filtrar por papel. Llenar tubos con 10 ml del medio de cultivo y taparlos con algodón. Esterilizar a 121 C. de presión durante 40 minutos. (10)

El microorganismo de prueba se siembra primero en caldo, ya sea que se parta de cepas liofilizadas, o simplemente de un cultivo de agar, por cuatro días consecutivos, procurando que dichas transferencias tengan lugar entre las 22-26 horas, con el objeto de que las bacterias se adapten al medio. Una vez transcurrido este tiempo se hacen dos resiembras simultáneas: una en gelosa nutritiva (de idéntica composición que el caldo más 1.5% de agar) y otra en caldo nutritivo. La primera tiene por objeto conservar al microorganismo durante un mes a una temperatura que puede variar entre 0-5 C., después de haber sido incubados a 37°C por 48 horas; la segunda, servirá para hacer las determinaciones, siendo aconsejable resemar antes de emplear el cultivo para una determinación. Los cultivos de agar deben renovarse mensualmente, después de haber practicado cuatro inoculaciones diarias en caldo nutritivo del cultivo viejo de agar.

Únicamente cultivos que den lectura dentro de los siguientes límites son considerados satisfactorios para la determinación del coeficiente fenólico: (1)

Fenol	5 min.	10 min.	15 min.
1:90	+ o O	+ o O	O
1:100	+	+	+ o O

Cuando se usa como microorganismo de prueba S. aureus, la resistencia que presente al fenol deberá ser:

1:60	+	-	-
1:70	+	+	+

Procedimiento.

- 1.—Hacer 10 diluciones convenientes, las cuales deben cubrir la concentración necesaria del desinfectante para matar a los microorganismos de prueba en un periodo de 5 — 15 min.. Para un trabajo rápido y de rutina, las disoluciones se pueden llevar a cabo directamente en los tubos de prueba, siendo preferible el empleo de matraces volumétricos cuando se necesitan resultados muy exactos, o cuando se prueban sustancias volátiles. Además de estas 10 diluciones del germicida problema, se hacen cinco diluciones de fenol:

1:120 (o sea 1 g de fenol en 120 ml de sol.)
 1:110
 1:100
 1:90
 1:80

- 2.—Transferir 5 ml de las diluciones finales a los tubos de ensaye (ya etiquetados) y ponerlos en el baño de agua a 20° C., por 5 minutos para que tomen la temperatura del agua, haciendo lo mismo con los

45 tubos con caldo nutritivo destinados a las transferencias, y con el microorganismo de prueba. En esta forma, quedan dos series, una de 20 tubos para el fenol y otra de 40 tubos para el germicida. Lo anterior se puede esquematizar en la siguiente forma:

SERIE I.

Dil. germicida	TUBOS DE SUBCULTIVO		
	5 min.	10 min.	15 min.
Dil. 1	1	1	1
Dil. 2	2	2	2
Dil. 3	3	3	3
Dil. 4	4	4	4
Dil. 5	5	5	5
Dil. 6	6	6	6
Dil. 7	7	7	7
Dil. 8	8	8	8
Dil. 9	9	9	9
Dil. 10	10	10	10

Total: 40 tubos

SERIE II.

Dil. fenol	TUBOS DE SUBCULTIVO		
	5 min.	10 min.	15 min.
Dil. 1	1	1	1
Dil. 2	2	2	2
Dil. 3	3	3	3
Dil. 4	4	4	4
Dil. 5	5	5	5

Total: 20 tubos

- 3.—Agregar 0.5 ml de la suspensión bacteriana a cada una de las diluciones, dejando pasar 30 segundos entre un tubo y otro. Cuando se terminan de inocular los 10 tubos, han transcurrido 4.5 minutos.
- 4.—Con el asa de platino, hacer una transferencia del primer tubo que contiene la mezcla de germicida y cultivo al primer tubo de caldo. Dejar pasar 30 segundos y repetir la misma operación con el tubo No. 2 y el correspondiente de subcultivo. Al finalizar las transferencias de los tubos que contienen las diluciones y el germen de prueba han transcurrido 9.5 minutos, de tal forma que se inicia un juego igual a los 10 minutos y a los 15 minutos el último.

Dil. germicida

TUBOS DE SUBCULTIVO

	5 min.	10 min.	15 min.
30 seg. <---1----->1-----1----->1			
30 seg. <---2----->2-----2	2	2	2
<---3----->3-----3	3	3	3
4	4	4	4
5	5	5	5
6	6	6	6
7	7	7	7
8	8	8	8
9	9	9	9
10<-----4.5 min. 10	10	10	10

Tiempo: 19 minutos.

5.—Esta misma prueba se repite con el fenol, sólo que el tiempo de transferencia en lugar de ser de 30 segundos es de un minuto.

Al inocular los tubos de las diluciones éstos deben estar en posición inclinada después de sacarlos del baño, y el cultivo debe ser agregado sin que la punta de la pipeta toque el desinfectante. Puede permitirse que la punta de la pipeta toque la pared del tubo justamente arriba de la superficie del líquido. Los tubos deben ser agitados suavemente pero de manera efectiva después de agregar el cultivo para estar seguro de que las bacterias se han distribuido bien.

Para facilitar la transferencia de gotas uniformes del tubo de la mezcla de la dilución y cultivo, o de un tubo de subcultivo a otro, es aconsejable que la punta del alambre de platino se doble en tal forma que tenga un ángulo de 60°. En otras palabras, cuando el asa de platino se retira, su plano debe ser paralelo a la superficie del líquido.

Antes de cada transferencia el asa de platino se calienta al rojo en la flama del mechero Bunsen y la boca de todos los tubos se flamea. La esterilización del asa se efectúa inmediatamente después de haber hecho la transferencia correspondiente (antes de flamear y tapar los tubos) para darle tiempo suficiente a que se enfríe. El tiempo no permite el flameado de los tubos antes de hacer la transferencia. Por esta razón es necesario tener cuidado en las resiembras.

Debe observarse especial cuidado de que tanto la pipeta de sembrado, como el asa de platino no toquen los lados o la base de los tubos de ensaye; tampoco debe haber fibrillas de algodón adheridas a la boca o a los lados de éstos.

Después de haber terminado las transferencias, los tubos de subcultivo se incuban a 37°C. por 48 horas, tiempo después del cual se hacen las lecturas. Generalmente la observación macroscópica es suficiente, y en algunos casos se puede recurrir a la microscópica; pueden em-

plearse reacciones de aglutinación con suero antitífídico para aquellos casos dudosos. Suele también recurrirse al examen mediante una estría en agar, especialmente cuando los microorganismos de prueba no fueron salmonelas.

Cierto tipo de germicidas, tales como muchos compuestos mercuriales dan resultados sumamente altos en las pruebas de coeficiente fenólico. Debido al gran valor inhibitorio de estas sustancias, al impedir el crecimiento de los subcultivos, se obtienen valores frecuentemente desconcertantes. Para germicidas usados en la desinfección de objetos, tales como instrumentos quirúrgicos, esto es en particular importante y debe tomarse en cuenta. La falta de apreciación de esta característica en algunos compuestos da fácilmente errores cuando se utiliza. *S. aureus* y no *S. typhosa* como organismos de prueba. No se obtienen estos valores falsos para productos de este tipo o para cualquier desinfectante dando valores sospechosamente altos, si los subcultivos contienen grandes cantidades de medio (no menos de 200 ml), o bien si se transfiere de ellos cuatro asas de platino del primer tubo de subcultivo a uno segundo con caldo, como recomienda Shippen.

Cálculo del coeficiente fenólico. Los resultados de la prueba se expresan en términos de coeficiente fenólico. Este, como ya se indicó anteriormente, representa el valor germicida de la dilución de un desinfectante comparada con la dilución de fenol. Este número se obtiene dividiendo el valor numérico de la máxima dilución de desinfectante capaz de matar a *Salmonella typhosa* en 10 minutos pero no en cinco, entre la mayor dilución de fenol que muestra el mismo efecto; el resultado es el coeficiente fenólico. Estos resultados se expresan como sigue:

Desinfectante (X)	5 min.	10 min.	15 min.
1:300	—	—	—
1:325	+	—	—
1:350	+	—	—
1:375	+	+	—
1:400	+	+	+
Fenol			
1:90	+	—	—
1:100	+	+	+

$$\text{Coeficiente fenólico: } \frac{350}{90} \therefore 3.89$$

IV. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

. Determinación de la sensibilidad de los microorganismos de prueba al fenol.

a) *Mycrococcus pyogenes* Var. aureus

Datos sobre la cepa.

Germen: *Staphylococcus aureus*.

Número y características de la cepa: (NH-13) para prueba de germicidas
Procedencia: Cepa liofilizada adquirida en el Instituto Nacional de Higiene.

Medio de cultivo que debe emplearse: Gelosa simple

Temperatura de incubación: 37°C.

Fecha de preparación: 26 de abril de 1960

CONSERVESE ENTRE 0°C. y 5°C.

PRUEBA No. 1

. Determinación de la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* al fenol.

Solución de Fenol.

Fenol 4 g
Agua c. b. p. 100 ml

Concentración: Sol. al 3.6%

Cepa: *Staphylococcus aureus*.

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Diluciones de Fenol</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:100	+	+	-
1:90	+	+	-
1:80	+	-	-
1:70	-	-	-
1:60	-	-	-

RESULTADO: Dil 1:80.

Llena los requisitos estipulados por el Servicio de Alimentos y Drogas.

PRUEBA No. 2

. Determinación de la sensibilidad de Staphylococcus aureus al fenol.

Solución de fenol.

Fenol 4 g
Agua c. b. p. 100 ml

Concentración: Sol. al 3.6%

Cepa: Staphylococcus aureus.

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Diluciones de fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:100	+	+	-
1:90	+	+	-
1:80	+	-	-
1:70	-	-	-
1:60	-	-	-

RESULTADO: Dil. 1:80

Llena los requisitos estipulados por el
Servicio de Alimentos y Drogas.

. Determinación de la sensibilidad de los microorganismos de prueba al fenol.

b) Salmonella typhosa

Datos sobre la cepa.

Germen: Salmonella typhosa

Número y características de la cepa: 6539. F.D.A. Hopkins Strain.

Germicide testing

Procedencia: American Type Culture Collection

Medio de cultivo que debe emplearse: Gelosa nutritiva

Temperatura de incubación: 37°C.

CONSERVESE ENTRE 0°C. y 5°C.

PRUEBA No. 3

. Determinación de la sensibilidad de Salmonella typhosa al fenol.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 4.28%

Cepa: Salmonella typhosa

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Diluciones de fenol</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	-
1:110	+	-	-
1:100	+	-	-
1:90	+	-	-
1:80	-	-	-

RESULTADO: Dil. 1:110.

Llena los requisitos estipulados por el Servicio de Alimentos y Drogas.

PRUEBA No. 4

Determinación de la sensibilidad de Salmonella typhosa al fenol.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
 Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 4.28%

Cepa: Salmonella typhosa

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Diluciones de fenol</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	-
1:110	+	-	-
1:100	+	-	-
1:90	+	-	-
1:80	-	-	-

RESULTADO: Dil. 1:110.

Llena los requisitos estipulados por el Servicio de Alimentos y Drogas.

PRUEBA No. 5

Determinación de la sensibilidad de Salmonella typhosa al fenol.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
 Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 4.28%

Cepa: Salmonella typhosa

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Diluciones de fenol</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	-
1:110	+	-	-
1:100	+	-	-
1:90	+	-	-
1:80	-	-	-

RESULTADO: Dil. 1:110.
Llena los requisitos estipulados por el Servicio de Alimentos y Drogas.

PRUEBA No. 6

. Germicida: 4 y 6 cloro 2. fenil fenol.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 4.28%

Solución patrón de 4 y 6 cloro 2. fenil fenol.

Jabón potásico 10 g
Hexilen-glicol 20 g
Metanol 10 g
4 y 6 cloro 2. fenil fenol 1 g
Agua c.b.p. 100 ml

pH: 8.6

Cepa: Staphylococcus aureus. (Resiembra No. 17).

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>4 y 6 cloro 2. fenil fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:22 000	+	+	+
1:21 000	+	+	-
1:20 000	+	+	-
1:19 000	+	+	+
1:18 000	+	+	+
1:17 000	+	+	-
1:16 000	+	+	-
1:15 000	+	+	-
1:14 000	+	+	-
1:13 000	+	+	-
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	-
1:110	+	+	-
1:100	+	+	-
1:90	+	-	-
1:80	+	-	-

RESULTADO: Coeficiente fenólico: Negativo.

PRUEBA No. 7

. Germicida: 4 y 6 cloro 2. fenil fenol.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 4.28%

Solución patrón de 4 y 6 cloro 2, fenil fenol.

Jabón potásico 10 g
Hexilen-glicol 20 g
Metanol 10 g
4 y 6 cloro 2, fenil fenol 1 g
Agua c.b.p. 100 ml

pH: 8.6

Cepa: Staphylococcus aureus. Resiembra No. 25).

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>4 y 6 cloro 2, fenil fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:15 000	+	+	-
1:14 000	+	+	-
1:13 000	+	+	-
1:12 000	+	+	-
1:11 000	+	+	-
1:10 000	-	-	-
1: 9 000	-	-	-
1: 8 000	-	-	-
1: 7 000	-	-	-
1: 6 000	-	-	-
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	-
1:110	+	+	-
1:100	+	+	-
1:90	+	-	-
1:80	+	-	-

RESULTADO: Coeficiente fenólico: $\frac{10\ 000}{90} = 111.1$

PRUEBA No. 8

Germicida: 4 y 6 cloro 2, fenil fenol.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 4.28%

Solución patrón de 4 y 6 cloro 2, fenil fenol.

Jabón potásico	10 g
Hexilen-glicol	20 g
Metanol	10 g
4 y 6 cloro 2. fenil fenol	1 g
Agua c.b.p.	100 ml

pH: 8.6

Cepa: Staphylococcus aureus. Resiembra No. 19).

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>4 y 6 cloro 2. fenil fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:12 000	+	+	-
1:11 000	+	+	-
1:10 000	+	-	-
1: 9 000	+	-	-
1: 8 000	+	-	-
1: 7 000	+	-	-
1: 6 000	-	-	-
1: 5 000	-	-	-
1: 4 000	-	-	-
1: 3 000	-	-	-
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	-
1:110	+	+	-
1:100	+	+	-
1:90	+	-	-
1:80	+	-	-

RESULTADO: Coeficiente fenólico: $\frac{10\ 000}{90} = 111.1$

PRUEBA No. 9

. Germicida: 4 y 6 cloro 2. fenil fenol.

Solución de fenol.

Fenol	10 g
Agua c.b.p.	200 ml

Concentración: Sol. al 3.83%

Solución patrón de 4 y 6 cloro. 2. fenil fenol.

Jabón potásico	10 g
Hexilen-glicol	20 g
Metanol	10 g
4 y 6 cloro 2. fenil fenol	1 g
Agua c.b.p.	100 ml

pH: 8.6

Cepa: Salmonella typhosa (Resiembra No. 15).

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>4 y 6 cloro 2. fenil fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:20 000	+	+	-
1:19 000	+	+	-
1:18 000	+	+	-
1:17 000	+	+	-
1:16 000	+	-	-
1:15 000	+	-	-
1:14 000	+	-	-
1:13 000	+	-	-
1:12 000	+	-	-
1:11 000	+	-	-
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	-
1:110	+	-	-
1:100	+	-	-
1:90	+	-	-
1:80	-	-	-

RESULTADO: Coeficiente fenólico: $\frac{16\,000}{110} = 145.4$

PRUEBA No. 10

Germicida: 4 y 6 cloro 2, fenil fenol.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 3.83%

Solución patrón de 4 y 6 cloro, 2, fenil fenol.

Jabón potásico 10 g
Hexilen-glicol 20 g
Metanol 10 g
4 y 6 cloro 2, fenil fenol 1 g
Agua c.b.p. 100 ml

pH: 8.6

Cepa: Salmonella typhosa (Resiembra No. 14).

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>4 y 6 cloro 2. fenil fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:20 000	+	+	—
1:19 000	+	+	—
1:18 000	+	+	—
1:17 000	+	+	—
1:16 000	+	+	—
1:15 000	+	+	—
1:14 000	+	—	—
1:13 000	+	—	—
1:12 000	+	—	—
1:11 000	+	—	—
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	—
1:110	+	—	—
1:100	—	—	—
1:90	—	—	—
1:80	—	—	—

RESULTADO: Coeficiente fenólico: $\frac{14\ 000}{110} = 127.2$

PRUEBA No. 11

Germicida: 4 y 6 cloro 2. fenil fenol.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
 Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 3.38%

Solución patrón de 4 y 6 cloro 2. fenil fenol.

Jabón potásico 10 g
 Hexilen-glicol 20 g
 Metanol 10 g
 4 y 6 cloro 2. fenil fenol 1 g
 Agua c.b.p. 100 ml

pH: 8.6

Cepa: Salmonella typhosa (Resiembra No. 21).

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>4 y 6 cloro 2. fenil fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:20 000	+	+	—
1:19 000	+	+	—
1:18 000	+	+	—

1:17 000	+	+	-
1:16 000	+	+	-
1:15 000	+	+	-
1:14 000	+	-	-
1:13 000	+	-	-
1:12 000	+	-	-
1:11 000	+	-	-
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	-
1:110	+	-	-
1:100	+	-	-
1:90	+	-	-
1:80	-	-	-

RESULTADO: Coeficiente fenólico: $\frac{14\ 000}{110} = 127.2$

PRUEBA No. 12

Germicida: Hexaclorofeno.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
 Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 2.23%

Solución patrón de hexaclorofeno.

Disolver 0.1 g de hexaclorofeno en 1 ml de alcohol etílico y 2 ml de una solución de hidróxido de potasio aproximadamente 0.5 N. Agitar. Adicionar la mezcla anterior a 75 ml de una solución de jabón potásico al 10%. Agitar. Llevar a 100 ml con agua desmineralizada, previamente hervida.

pH: 9.2

Cepa: Staphylococcus aureus. (Resiembra No. 6).

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Hexaclorofeno.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:11 000	-	-	-
1:10 000	-	-	-
1: 9 000	-	-	-
1: 8 000	-	-	-
1: 7 000	-	-	-
1: 6 000	-	-	-
1: 5 000	-	-	-
1: 4 000	-	-	-
1: 3 000	-	-	-
1: 2 000	-	-	-

<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	-
1:110	+	+	-
1:100	+	+	-
1:90	+	+	-
1:80	-	-	-

RESULTADO: NEGATIVO.

PRUEBA No. 13

Germicida: Hexaclorofeno.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
 Agua c.b.p. 200 ml

Solución patrón de hexaclorofeno.

Disolver 0.1 g de hexaclorofeno en 1 ml de alcohol etílico y 2 ml de una solución de hidróxido de potasio aproximadamente 0.5 N. Agitar. Adicionar la mezcla anterior a 75 ml de una solución de jabón potásico al 10%. Agitar. Llevar a 100 ml con agua desmineralizada, previamente hervida.

pH: 9.2

Cepa: Staphylococcus aureus. (Resiembra No. 13).

<u>Hexaclorofeno.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:11 000	+	+	-
1:10 000	+	+	-
1: 9 000	+	+	-
1: 8 000	+	+	-
1: 7 000	+	+	-
1: 6 000	+	+	-
1: 5 000	+	+	-
1: 4 000	+	+	-
1: 3 000	+	-	-
1: 2 000	+	-	-
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	-
1:110	+	+	-
1:100	+	+	-
1:90	+	-	-
1:80	+	-	-

RESULTADO: Coeficiente fenólico: $\frac{3\ 000}{90} = 33.3$

PRUEBA No. 14

Germicida: Hexaclorofeno.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
 Agua c.b.p. 200 ml

Solución patrón de hexaclorofeno.

Disolver 0.1 g de hexaclorofeno en 1 ml de alcohol etílico y 2 ml de una solución de hidróxido de potasio aproximadamente 0.5 N. Agitar. Adicionar la mezcla anterior a 75 ml de una solución de jabón potásico al 10%. Agitar. Llevar a 100 ml con agua desmineralizada, previamente hervida.

pH: 9.2.

Cepa: Staphylococcus aureus.

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Hexaclorofeno.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1: 6 500	+	+	-
1: 6 000	+	+	-
1: 5 500	+	+	-
1: 5 000	+	+	-
1: 4 500	+	+	-
1: 4 000	+	+	-
1: 3 500	+	+	-
1: 3 000	+	-	-
1: 2 500	+	-	-
1: 2 000	+	-	-
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	-
1:110	+	+	-
1:100	+	+	-
1:90	+	-	-
1:80	+	-	-

RESULTADO: Coeficiente fenólico: $\frac{3000}{90} = 33.3$

PRUEBA No. 15

Germicida: Hexaclorofeno.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
 Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 4.16%

Solución patrón de hexaclorofeno.

Jabón potásico	10 g
Hexilen-glicol	20 g
Metanol	10 g
Hidróxido de potasio ...	1 ml de una sol. al 50%
Hexaclorofeno	1 g
Agua c.b.p.	100 ml

pH: 8

Cepa: *Staphylococcus aureus*. (Resiembra No. 25).

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Hexaclorofeno.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1: 6 500	+	+	—
1: 6 000	+	+	—
1: 5 500	+	+	—
1: 5 000	+	+	—
1: 4 500	+	+	—
1: 4 000	+	+	—
1: 3 500	+	+	—
1: 3 000	+	—	—
1: 2 500	+	—	—
1: 2 000	+	—	—
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	—
1:110	+	+	—
1:100	+	+	—
1:90	+	—	—
1:80	+	—	—

RESULTADO: Coeficiente Fenólico: $\frac{3\ 000}{90} = 33.3$

PRUEBA No. 16

Germicida: Hexaclorofeno.

Solución de fenol.

Fenol	10 g
Agua c.b.p.	200 ml

Concentración: Sol. al 3.38%

Solución patrón de hexaclorofeno.

Jabón potásico	10 g
----------------------	------

Hexilen-glicol 20 g
 Metanol 10 g
 Hidróxido de potasio ... 1 ml de una sol. al 50%
 Hexaclorofeno 1 g
 Agua c.b.p. 100 ml

pH: 8

Cepa: *Salmonella typhosa* (Resiembra No. 22).

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Hexaclorofeno.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1: 1000	+	+	—
1: 900	+	+	—
1: 800	+	+	—
1: 700	+	+	—
1: 600	+	+	—
1: 500	+	+	—
1: 400	+	+	—
1: 300	+	+	—
1: 200	+	—	—
1: 100	+	—	—
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	—
1:110	+	+	—
1:100	+	—	—
1:90	+	—	—
1:80	+	—	—

RESULTADO: Coeficiente fenólico: $\frac{200}{100} = 2$

PRUEBA No. 17

Germicida: Hexaclorofeno.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
 Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 3.83%

Solución patrón de hexaclorofeno.

Jabón potásico 10 g
 Hexilen-glicol 20 g
 Metanol 10 g
 Hidróxido de potasio ... 1 ml de una sol. al 50%
 Hexaclorofeno 1 g
 Agua c.b.p. 100 ml

pH: 8

Cepa: *Salmonella typhosa* (Resiembra No. 24).

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Hexaclorofeno.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1: 1 000	+	+	—
1: 900	+	+	—
1: 800	+	+	—
1: 700	+	+	—
1: 600	+	+	—
1: 500	+	+	—
1: 400	+	+	—
1: 300	+	+	—
1: 200	+	—	—
1: 100	+	—	—

<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	—
1:110	+	+	—
1:100	+	—	—
1:90	+	—	—
1:80	—	—	—

RESULTADO: Coeficiente fenólico: $\frac{200}{100} = 2$

PRUEBA No. 18

Germicida: Mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
Agua c.b.p. 200 ml
Concentración: Sol. al 3.6%

Solución patrón de la mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución acuosa que contiene 0.05% de yodo libre. El pH se lleva a 2.5 empleando ácido clorhídrico concentrado Q.P.

Cepa: *Staphylococcus aureus*.

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Mezcla de yodo y surfactante.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:11 000	+	+	—
1:10 500	+	+	—
1:10 000	+	+	—
1: 9 500	+	+	—
1: 9 000	+	+	—

1: 8 500	+	-	-
1: 8 000	+	-	-
1: 7 500	+	-	-
1: 7 000	+	-	-
1: 6 500	+	-	-
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	-
1:110	+	+	-
1:100	+	+	-
1:90	+	-	-
1:80	+	-	-
RESULTADO: Coeficiente fenólico:	$\frac{8\ 500}{90}$	=	94.4

PRUEBA No. 19

Germicida: Mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
 Agua c.b.p. 200 ml
 Concentración: Sol. al 3.06%

Solución patrón de la mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución acuosa que contiene 0.038% de yodo libre. El pH se lleva a 2.5 empleando ácido clorhídrico concentrado Q.P.

Cepi: Staphylococcus aureus.

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Mezcla de yodo y surfactante.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1: 8 900	+	+	-
1: 8 800	+	+	-
1: 8 700	+	+	-
1: 8 600	+	+	-
1: 8 500	+	-	-
1: 8 400	+	-	-
1: 8 300	-	-	-
1: 8 200	-	-	-
1: 8 100	-	-	-
1: 8 000	-	-	-
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	-
1:110	+	+	-
1:100	+	+	-

	+	-	-
1:90	+	-	-
1:80	+	-	-
RESULTADO: Coeficiente fenólico:	8 500	= 94.4	
	90		

PRUEBA No. 20

Germicida: Mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
 Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 3.06%

Solución patrón de la mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución acuosa que contiene 0.038% de yodo libre. El pH se lleva a 2.5 empleando ácido clorhídrico concentrado Q.P.

Cepa: Staphylococcus aureus.

<u>Mezcla de yodo y surfactante.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1: 8 900	+	+	-
1: 8 800	+	+	-
1: 8 700	+	+	-
1: 8 600	+	+	-
1: 8 500	+	-	-
1: 8 400	+	-	-
1: 8 300	-	-	-
1: 8 200	-	-	-
1: 8 100	-	-	-
1: 8 000	-	-	-
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	-
1:110	+	+	-
1:100	+	+	-
1:90	+	-	-
1:80	+	-	-

RESULTADO: Coeficiente fenólico: $\frac{8\ 500}{90} = 94.4$

PRUEBA No. 21

Germicida: Mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución de fenol.

1:90
1:80

+

-

-

RESULTADO: Coeficiente fenólico: $\frac{8\ 500}{90} = 94.4$

PRUEBA No. 20

Germicida: Mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 3.06%

Solución patrón de la mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución acuosa que contiene 0.038% de yodo libre. El pH se lleva a 2.5 empleando ácido clorhídrico concentrado Q.P.

Cepa: Staphylococcus aureus.

<u>Mezcla de yodo y surfactante.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1: 8 900	+	+	-
1: 8 800	+	+	-
1: 8 700	+	+	-
1: 8 600	+	+	-
1: 8 500	+	-	-
1: 8 400	+	-	-
1: 8 300	-	-	-
1: 8 200	-	-	-
1: 8 100	-	-	-
1: 8 000	-	-	-
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	-
1:110	+	+	-
1:100	+	+	-
1:90	+	-	-
1:80	+	-	-

RESULTADO: Coeficiente fenólico: $\frac{8\ 500}{90} = 94.4$

PRUEBA No. 21

Germicida: Mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
 Agua c.b.p. 200 ml
 Concentración: Sol. al 4.75%

Solución patrón de la mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución acuosa que contiene 0.03% de yodo libre. El pH se lleva a 2.5 empleando ácido clorhídrico concentrado Q.P.

Cepa: Salmonella typhosa (Resiembra No. 28).

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Mezcla de yodo y surfactante.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:16 000	—	—	—
1:15 000	—	—	—
1:14 000	—	—	—
1:13 000	—	—	—
1:12 000	—	—	—
1:11 000	—	—	—
1:10 000	—	—	—
1: 9 000	—	—	—
1: 8 000	—	—	—
1: 7 000	—	—	—
Fenol.	5 min.	10 min.	15 min.
1:120	+	+	—
1:110	+	+	—
1:100	+	—	—
1:90	+	—	—
1:80	+	—	—

RESULTADO: Coeficiente fenólico: Negativo.

PRUEBA No. 22.

Germicida: Mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
 Agua c.b.p. 200 ml
 Concentración: Sol. al 4.75%.

Solución patrón de la mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución acuosa que contiene 0.03% de yodo libre. El pH se lleva a 2.5 empleando ácido clorhídrico concentrado Q.P.

Cepa: Salmonella typhosa (Resiembra No. 5).

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Mezcla de yodo y surfactante</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:50 000	+	—	—

1:45 000	+	-	-
1:40 000	-	-	-
1:35 000	-	-	-
1:30 000	-	-	-
1:25 000	-	-	-
1:20 000	-	-	-
1:15 000	-	-	-
1:10 000	-	-	-
1: 5 000	-	-	-
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	-	-
1:110	+	-	-
1:100	+	-	-
1:90	+	-	-
1:80	-	-	-

RESULTADO: Coeficiente fenólico: Negativo.

PRUEBA No. 23

. Germicida: Mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
 Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 4.75%

Solución patrón de la mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución acuosa que contiene 0.03% de yodo libre. El pH se lleva a 2.5 empleando ácido clorhídrico concentrado Q.P.

Cepa: Salmonella typhosa (Resiembra No. 9).

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Mezcla de yodo y surfactante.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:100 000	+	+	-
1: 95 000	+	+	-
1: 90 000	+	+	-
1: 85 000	+	+	-
1: 80 000	+	+	-
1: 75 000	+	+	-
1: 70 000	+	+	-
1: 65 000	+	+	-
1: 60 000	+	+	-
1: 55 000	+	+	-
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	-	-

1:110	+	-	-
1:100	+	-	-
1:90	-	-	-
1:80	-	-	-

RESULTADO: Coeficiente fenólico: Negativo.

PRUEBA No. 24

Germicida: Mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
 Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 4.75%

Solución patrón de la mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución acuosa que contiene 0.03% de yodo libre. El pH se lleva a 2.5 empleando ácido clorhídrico concentrado Q.P.

Cepa: Salmonella typhosa (Resiembra No. 11).

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Mezcla de yodo y surfactante.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:100 000	+	-	-
1: 95 000	+	-	-
1: 90 000	+	-	-
1: 85 000	+	-	-
1: 80 000	+	-	-
1: 75 000	+	-	-
1: 70 000	-	-	-
1: 65 000	-	-	-
1: 60 000	-	-	-
1: 55 000	-	-	-
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	-
1:110	+	+	-
1:100	+	-	-
1:90	+	-	-
1:80	-	-	-

RESULTADO: Coeficiente fenólico: Negativo.

PRUEBA No. 25

Germicida: Mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
 Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 4.75%

Solución patrón de la mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución acuosa que contiene 0.03% de yodo libre. El pH se lleva a 2.5 empleando ácido clorhídrico concentrado Q.P.

Cepa: Salmonella typhosa (Resiembra No. 14).

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Mezcla de yodo y surfactante.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:150 000	—	—	—
1:145 000	—	—	—
1:140 000	—	—	—
1:135 000	—	—	—
1:130 000	—	—	—
1:125 000	—	—	—
1:120 000	—	—	—
1:115 000	—	—	—
1:110 000	—	—	—
1:105 000	—	—	—
<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	—
1:110	+	+	—
1:100	+	—	—
1:90	+	—	—
1:80	—	—	—

RESULTADO: Coeficiente fenólico: Negativo.

PRUEBA No. 26

Germicida: Mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución de fenol.

Fenol 10 g
Agua c.b.p. 200 ml

Concentración: Sol. al 4.75%

Solución patrón de la mezcla de yodo y surfactante no-iónico.

Solución acuosa que contiene 0.03% de yodo libre. El pH se lleva a 2.5 empleando ácido clorhídrico concentrado Q.P.

Cepa: Salmonella typhosa (Resiembra No. 18).

Temperatura del ensayo: 20°C.

<u>Mezcla de yodo y surfactante.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:150 000	—	—	—
1:135 000	—	—	—
1:120 000	—	—	—

1:105 000	—	—	—
1: 90 000	—	—	—
1: 75 000	—	—	—
1: 60 000	—	—	—
1: 45 000	—	—	—
1: 30 000	—	—	—
1: 25 000	—	—	—

<u>Fenol.</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:120	+	+	—
1:110	+	—	—
1:100	+	—	—
1:90	—	—	—
1:80	—	—	—

RESULTADO: Coeficiente fenólico: Negativo.

Los coeficientes fenólicos para cada germicida son:

GERMICIDA	COEFICIENTE FENOLICO	
	<u>S. aureus</u>	<u>S. typhosa</u>
Hexaclorofeno	33.3	2
4 y 6 cloro 2, fenil fenol	111.1	127.2
Mezcla de yodo y surfactante no-iónico	94.4	*

* En todas las pruebas se obtuvieron resultados negativos.

El poder germicida de la mezcla de yodo y surfactante no iónico se debe al halógeno. Por los resultados obtenidos en las últimas determinaciones, el método F.D.A. no es recomendable para este tipo de germicidas, por el hecho de que el yodo presenta una acción casi instantánea. Sin embargo, como se indicó anteriormente, se obtuvieron algunos coeficientes positivos empleando como microorganismos de prueba Staphylococcus aureus. Posiblemente ello se deba a que S. aureus es más resistente a cualquier agente antibacteriano que Salmonella typhosa.

En dichas determinaciones se cubrieron concentraciones de yodo libre desde 0.0008% (Dil 1:150 000), hasta 0.02% (Dil 1:5 000). Estos resultados se explican en parte por lo expuesto por Schwarz en el libro titulado "Sanitary Chemicals",¹⁰ en donde hace hincapié en el hecho de que el coeficiente fenólico no se adapta bien en cierto tipo de sustancias que tienen como agente activo cloro o cualquier oxidante, debido

a que son muy sensibles en presencia de materia orgánica. Por otra parte, Gersherfeld y Wittin (1949 (9) comprobaron que las soluciones de yodo desarrollan contra Staphylococcus aureus una actividad antibacteriana más eficaz que el cloro o el bromo, en presencia o en ausencia de materia orgánica, no especificando si dichos resultados fueron obtenidos evaluando el poder germicida de los halógenos por el método F. D. A.

Es importante hacer notar que en vista de tales opiniones el producto está aún en investigación en el laboratorio correspondiente, aunque los últimos informes recibidos indican que para determinar el coeficiente fenólico del Antarox VRO-20 es necesario adicionar un detergente, el cual desempeña el papel de estabilizador.

En general, para probar el poder bactericida, fungicida y viricida de este producto, los laboratorios recomiendan el uso de la siguiente formulación:

Mezcla de yodo-surfactante no-iónico (con 1.75% de yodo disponible)	8.75 %
Detergente	5.00 %
Ac. fosfórico (100%)	8.50 %
Agua	77.75 %
	100.00 %

con la cual obtuvieron los siguientes resultados:

TODO	ORGANISMO	TEMP. ENSAYO	MEDIO DE SUBCULTIVO	COEFICIENTE FENOLICO
A.O.A.C. (F.D.A.)	<u>Salmonella</u> <u>typhosa</u>	20°C.	Caldo-tioglicolato de sodio.	4.4
A.O.A.C. (F.D.A.)	<u>Staphylococcus</u> <u>aureus</u>	20°C.	Caldo-tioglicolato de sodio.	6.8

Por estos datos se deduce, que si se puede aplicar el método F.D.A. para evaluar germicidas que tienen como principio activo yodo, siempre y cuando se utilice un estabilizador y un medio de subcultivo que contenga sustancias reductoras. No se pudo determinar en este trabajo si ambas modificaciones son indispensables, o bien si sólo una de ellas es suficiente. De cualquier manera, ello implicaría determinaciones múltiples que incluyen variación de condiciones específicas para cada germicida, lo cual queda por así decirlo, fuera de tema.

A pesar de haber limitaciones y algunas discrepancias de cuales germicidas pueden ser evaluados por el método R-W modificado, ello no significa que la técnica sea inexacta, sino que por el contrario es indicio de que deben seguirse exactamente, punto por punto, cada una de las indicaciones que ahí se hacen.

Los resultados erróneos obtenidos en el transcurso de las determinaciones no figuran entre los resultados de cada germicida, y aunque no puede saberse con exactitud cual fue la causa o factores que más influyeron en estos resultados, se pueden hacer ciertas consideraciones que están muy distantes de ser reglas generales, reduciéndose simplemente a unas cuantas observaciones.

Ahora bien, tomando en cuenta que la preparación del medio de cultivo y las diluciones finales de los germicidas, o la resiembra diaria de un germen no representa ninguna novedad para el químico, el factor que suele presentar mayores probabilidades de error es la manipulación misma, reduciéndose a los siguientes puntos:

- 1.---Tiempo y temperatura.
- 2.---Esterilización del alambre de platino.
- 3.---Forma de hacer la transferencia.
- 4.---Agitación correcta de los tubos de subcultivo.

1.---Tiempo y temperatura. La mayoría de los germicidas aumenta su potencia cuando se alarga el tiempo de exposición y se eleva la temperatura. Los coeficientes feróhicos que dan resultados negativos debidos a una temperatura inadecuada son esporádicos, siendo lo más frecuente, por tanto, el tiempo. Durante las primeras determinaciones el tiempo de acción del germicida suele ser irregular, pues el intervalo de tiempo entre una transferencia y la siguiente no es constante en la mayor parte de los casos, habiendo una variación promedio de 2-4 décimas de segundo, y aunque teóricamente este lapso es insignificante, en la práctica se obtuvieron pruebas erróneas hasta que se logró dominar perfectamente la técnica en cuanto a manipulación, y con ello un tiempo de transferencia constante, no solamente en cuanto a adición del microorganismo de prueba a la dilución final de germicida, o de un tubo de subcultivo a otro, sino también en lo que se refiere a número de segundos que se flamea el asa de platino, o la boca de los tubos, agitación de los mismos una vez hecha la transferencia, y el tiempo que permanece el inoculo en el alambre de platino. El total de segundos que se emplean en cada una de es-

tas operaciones da el tiempo de acción del germicida en 5, 10 y 15 minutos. Así, la variación en cualquier sentido altera la constancia en una o en otra parte y, por tanto, el tiempo de acción del agente ya no fue constante.

2.—Esterilización del alambre de platino. Tal como la técnica lo recomienda, debe llevarse a cabo después de haber inoculado cada tubo, siendo muy importante que el tiempo de flameado sea siempre el mismo. Cuando esto no sucede, pueden obtenerse resultados con falsas positivas en tubos en los cuales, por lógica, no debería haber desarrollo bacteriano. Además, es muy importante que la posición del asa de platino cuando se flamea sea vertical, comenzando por la parte más baja de la flama y terminando en la parte más alta, ya que de lo contrario el excesivo calor produce la evaporación violenta del líquido que lleva el asa, lo que hace que algunos gérmenes caigan fuera de la flama con el enorme peligro de una contaminación.

La esterilización del alambre de platino en la forma antes indicada es más efectiva tanto en lo que se refiere a tiempo como en seguridad. También es de suma importancia que cuando el asa se introduzca al medio correspondiente esté perfectamente fría, ya que de no ser así, se corre el peligro de matar a los posibles gérmenes ahí existentes.

3.—Forma de hacer la transferencia. Debe procurarse no tocar en absoluto las paredes del tubo o con el asa de platino, porque puede quedar el inóculo en las mismas, o sencillamente contaminar el medio con la parte que por fuerza no fue esterilizada y que queda dentro de él.

4.—Agitación correcta de los tubos de subcultivo. También es importante el flameado de la boca de los tubos y la agitación suave y efectiva de todos y cada uno de ellos con el objeto de distribuir mejor a las bacterias dentro del medio.

El total de determinaciones que dieron resultados erróneos debido a los defectos mencionados en la manipulación fue aproximadamente de 12, de los cuales uno de ellos es:

Germicida: Hexaclorofeno.

Solución de fenol

	Fenol	10 g
	Agua c.b.p.	200 ml
Concentración:	Sol. al 1.7%	

Solución patrón de hexaclorofeno.

	Hexaclorofeno	0.2 g
	Hexilén-glicol	25 ml
	Jabón potásico	50 g
	Sol. conc. de KOH	0.5 ml
	Agua c.b.p.	200 ml

Disolver el hexaclorofeno en 25 ml de hexilen-glicol con ayuda de calentamiento. Agregarlo al jabón potásico contenido en un matraz volumétrico de 200 ml. Agitar. Agregar 5 ml. de una solución saturada de hidróxido de potasio. Diluir con agua a 200 ml

pH: 9.7

Cepa: Staphylococcus aureus.

Temperatura de ensayo: Entre 20-22°C.

<u>Hexaclorofeno</u>	<u>5 min.</u>	<u>10 min.</u>	<u>15 min.</u>
1:3 500	+	+	-
1:3 400	+	+	-
1:3 300	+	-	-
1:3 200	+	+	-
1:3 100	-	+	-
1:3 000	+	+	-
1:2 900	+	+	-
1:2 800	+	+	-
1:2 700	+	+	-
1:2 600	-	+	-
<u>Fenol</u>			
1:100	+	+	-
1:90	+	+	-
1:80	-	-	-
1:70	+	+	-
1:60	+	-	-

Otro de los factores que no deben descuidarse es la composición del medio de cultivo, tanto en lo que se refiere a los componentes mismos como al pH; la presencia de una gran cantidad de materia orgánica reduce mucho la actividad de todos los germicidas. Entre esa materia orgánica se encuentran las proteínas, aminoácidos y otras sustancias de composición similar. Así, si se emplean extractos de carne de tres procedencias distintas, los coeficientes de fenol son también diferentes. En general, un microorganismo resiste mejor condiciones adversas en su pH óptimo; cualquier cambio de reacción del medio en uno y otro sentido aumenta la sensibilidad de los gérmenes frente al agente antibacteriano.

A pesar de que la técnica recomienda solo dos controles de fenol para cada germen, debe practicarse un control completo en cada determinación porque suelen presentarse variaciones en la sensibilidad de los organismos de prueba al fenol, especialmente Salmonella typhosa, lo que motiva variaciones hasta de un 10% entre un resultado y otro. También se ha observado que la resistencia de las bacterias aumenta, aunque no por regla general, en forma proporcional al número de resiembras, siendo más sensible S. typhosa que Staphylococcus aureus.

En un principio el coeficiente fenólico se utilizó para comparar el poder germicida del fenol con otras sustancias químicamente relacionadas con él, pero en la actualidad se emplea para valorar compuestos que difieren completamente del fenol, tanto en lo que se refiere a estructura química como en actividad, tales como el cloro y sus combinaciones, el mercurio, yodo, germicidas cuaternarios de amonio, etc., dando resultados muy diversos. También ha sido modificado en el sentido de que el método original emplea agua como diluyente, pero a veces suele sustituirse por alcohol para aumentar la potencia germicida del producto que se estudia. Así mismo, se ha utilizado agua alcalinizada con ciertos germicidas solubles en soluciones alcalinas, pero no en agua sola. Los coeficientes de fenol así obtenidos no representan una comparación auténtica de los productos desinfectantes y el fenol.

El método del Servicio de Alimentos y Drogas para evaluación de germicidas destinados a uso externo, expresa la relación entre la eficacia germicida de un desinfectante y la eficacia del fenol en idénticas circunstancias. Este índice, además, muestra la sensibilidad de un microorganismo hacia un determinado agente antibacteriano, indicando cual es la concentración del producto que es germicidamente activo.

Cuando la sensibilidad del microorganismo de prueba al bactericida es muy grande, el dato cobra gran valor puesto que puede tomarse como un indicio para su uso en la terapia interna. Sin embargo, esto no quiere decir que el método F. D. A., sea una prueba para evaluar germicidas destinados a la vía interna, ya que no habla de los efectos del agente frente a los tejidos, pero sí puede ser utilizada como primer paso en la investigación de la sensibilidad de un microorganismo a un germicida, seguida de pruebas específicas para determinar la toxicidad en tejidos y organismos vivos.

En otras palabras, la técnica F. D. A., puede tener dos aplicaciones:

- 1.—Evaluación de desinfectantes.
- 2.—Investigación de la sensibilidad de un germen determinado hacia un agente bactericida.

V.—REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) *Bailey, E. M.; Warren, L. E.; Sale, J. W.; Frary, G. G.; Lepper, H. A.; and Lapp, E.*—Official and tentative Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists.—Págs. 75, 76, 77 y 78.—Fifth Edition.—Published by the Association of Official Agricultural Chemists.—Washington, D. C., 1940.
- (2) *Breed, R. S. y cols.*—Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.—The Williams & Wilkins Company.—Baltimore, 1957.
- (3) *Bryan, Arthur H., Bryan, Charles G.*—Bacteriology. Principles and practice. First Edition.—Barnes & Noble, Inc.—New York, 1960.
- (4) *Cook, E. F., y Martin, E. W.*—Farmacia Práctica de Remington. Traducida al español de la 10ª edición en inglés por el Dr. Oscar Carrera.—Pág. 799, 816.—Unión tipográfica, Editorial Hispano Americana.—México, D. F., 1953.
- (5) *Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos.*—Págs. 176, 177. 2ª Edición.—Talleres Gráficos de la Nación.—México, 1952.
- (6) *Jawetz, Ernest; Melnick, Joseph L.; Adelberg, Edward A.*—Review of Medical Microbiology.—Third Edition.—Lange Medical Publications, Los Altos, California, 1958.
- (7) *M. L. d'Alcours de Vidal.* (Traductor).—Productos germicidas para el consumidor hechos con: Antarox VRO-20, Antara Chemicals, A sales division of General Aniline and Film Corporation. — Folleto No. 14
- (8) *Orozco D., Fernando.*—Análisis Químico Cuantitativo.—Págs. 204-355. Tercera Edición.—Editorial Porrúa, S. A.—México, 1949.
- (9) *Salle, A. J.*—Bacteriología.—Versión de la 4ª edición norteamericana por Ignacio Rodrigo García, Químico Farmacéutico.—Editorial Gustavo Gili, S. A.—Barcelona, 1957.
- (10) *Schwartz, Leonard.*—Sanitary Chemicals.—Mac Nair-Dorland Company Publishers.—New York 1, N. Y., 1953.
- (11) *Sindar Corporation.*—The Story of G-11 (hexachlorophene).—New York 18, N. Y.—October, 1950.
- (12) *Sindar Corporation.*—Technical Bulletin.—H-2.—G11 Hexachlorophene U.S.P.).—Chemical and Physical Properties.—New York 36, N. Y.—September, 1955.