



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

DESARROLLO DE UNA FORMULACION PARA UN  
SANITIZANTE BIODEGRADABLE

**T E S I S**

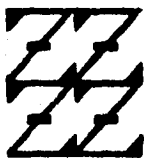
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**MARIA DEL ROSARIO BENITEZ VELAZQUEZ**

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HUMANO ES  
DE NUESTRA CEFERION

DIRECTOR DEL PROYECTO:  
Q.F.B. CESAR ESCAMILLA FLORES

MEXICO, D. F.

FEBRERO DE 1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE**

Q.F.B. DOMITILA BURGOS JARA

**VOCAL**

Q.F.B. CESAR ESCAMILLA FLORES

**SECRETARIO**

Q.B.P. DORA ALICIA PEREZ GONZALEZ

**SUPLENTE**

Q.F.B. JOSE OSCAR GONZALEZ MORENO

**SUPLENTE**

Q.F.B. ESPERANZA JIMENEZ CASTAÑEDA

SITIO EN DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO FARMACEÚTICO DE LA PLANTA PILOTO DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES ZARAGOZA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

IMPORTADORA Y MANUFACTURERA BRULUART DE MEXICO S.A. DE C.V.

FES ZARAGOZA UNAM, MÉXICO D.F., 1996

**SUSTENTANTE:**

MARIA DEL ROSARIO BENITEZ VELAZQUEZ

**DIRECTOR DEL TRABAJO:**

Q.F.B. CESAR ESCAMILLA FLORES

## DEDICATORIAS:

*Este trabajo se lo dedico muy especialmente a mi madre la Sra. Ma. del Rosario Velázquez Zamora, por dedicar parte de su vida a mí.*

*Principalmente dedico todo este esfuerzo y trabajo al único que me dió la vida, el amor y la paciencia para realizarlo a ti ... DIOS.*

## AGRADECIMIENTOS:

*Agradezco a:*

*A mi asesor el Q.F.B. César Escamilla Flores; por darme la oportunidad de llevar este proyecto a una realidad, con su apoyo y experiencia... GRACIAS.*

*A la Q.F.B. Marta I. Romero Moreno, por su ayuda y apoyo en la realización de este proyecto.*

*A la Q.F.B. Sara Valencia Hernández y a todos los integrantes del Departamento de Microbiología de Laboratorios Bruluart de México S.A. de C.V. por su valiosa colaboración, haciendo posible la realización de este proyecto*

*A mi asesora y amiga: Q.F.B. Esperanza Jiménez Castañeda; por su apoyo, cariño y amistad.*

*A mi hermano: el Sr. Lic C.P.. Rafael Benítez Velázquez, por su contribución a la causa.*

*A mis padres: a la Sra. Ma. del Rosario Velázquez Zamora y al Sr. Rafael Benítez Becerril, por hacer de mí lo que soy.*

*Muy en especial agradezco a cada uno de mis maestros que me brindaron sus conocimientos desde los primeros años de escuela hasta mi carrera profesional.*

# TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA.....</b>	<b>3</b>
2.1. EL PROCESO DE LIMPIEZA.....	3
2.2. SANITIZACIÓN.....	7
2.2.1. SANITIZANTES Y AGENTES GERMICIDAS.....	7
2.2.1.1. DEFINICIONES.....	7
2.2.1.2. CLASIFICACIÓN.....	10
2.2.1.3. MECANISMO DE ACCIÓN.....	11
2.2.1.4. CARACTERÍSTICAS IDEALES DE UN SANITIZANTE.....	14
2.2.1.5. COEFICIENTE FENÓLICO.....	14
2.2.1.6. TOXICIDAD DE SANITIZANTES Y DETECCIÓN DE RESIDUOS.....	16
2.3. CUARTO LIMPIO.....	18
2.3.1. USO DE SANITIZANTES.....	20
2.3.2. CICLADO DE LA SANITIZACIÓN.....	20
2.4. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	22
2.4.1. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS.....	22
2.4.2. MONOGRAFÍA.....	23
2.5. ÁCIDO ACÉTICO.....	24
2.5.1. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS.....	24
2.5.2. MONOGRAFÍA.....	24
2.6. CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS DE PRUEBA PARA EL SANITIZANTE.....	25
2.6.1. MORFOLOGÍA DE LA COLONIA BACTERIANA.....	25
2.6.1.1. SALMONELLA.....	26
2.6.1.2. ESCHERICHIA.....	28
2.6.1.3. PSEUDOMONA.....	29
2.6.1.4. BACILLUS.....	31
2.6.1.5. STAPHYLOCOCCUS.....	33
2.6.2. HONGOS.....	35
2.6.2.1. ASPERGILLUS.....	35
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>37</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>38</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
6.1. MATERIAL.....	40
6.2. EQUIPO.....	41
6.3. MATERIAL BIOLÓGICO.....	41
6.4. REACTIVOS.....	42
6.5. METODOLOGÍA.....	44
6.5.1. DIAGRAMA DE FLUJO.....	44
6.5.2. ESTUDIOS DE PREFORMULACIÓN.....	45
6.5.3. ESTUDIOS DE FORMULACIÓN.....	51
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
<b>8. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>88</b>
<b>10. COMENTARIOS Y/O SUGERENCIAS.....</b>	<b>90</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>91</b>

# **1. INTRODUCCIÓN**

El proceso de sanitización de áreas asépticas es una compleja tecnología que contribuye enormemente en la calidad final del producto. Es importante mencionar que todo buen producto cuenta con un adecuado control de todos los factores que intervienen durante su fabricación; por ello, la sanitización se ha considerado un pilar importante que contribuye en la mayor parte del proceso de fabricación de un medicamento. Debido a esto, los factores que se involucran en la sanitización deben ser evaluados en su totalidad. Uno de estos factores, el cual podría ser considerado el más importante, es el tipo de sanitizante empleado.

Para facilitar la elección de un sanitizante debe tomarse en cuenta aspectos tales como: costo, tipo de material a utilizar, tipo de superficie, y la naturaleza del mismo. De ahí que actualmente algunos investigadores enfoquen su atención en realizar estudios relacionados a la preformulación y formulación de sanitizantes, así como su fabricación, métodos de aplicación, métodos de limpieza, métodos de detección de residuos, en el producto terminado.

En la actualidad se encuentra muy en voga el término biodegradable, el cual se aplica, a procesos o productos que no producen contaminación al medio ambiente.

Al respecto, recientemente se ha hecho necesario elaborar productos con procesos altamente sofisticados que permitan reducir, la cantidad de desechos tóxicos arrojados al medio ambiente y además buscar la forma de degradarlos por medios biológicos.

Un ejemplo de ello son los microorganismos utilizados en el tratamiento de residuos, que tienen como objeto la descontaminación ambiental de aguas residuales mediante la cual y de manera secundaria, la biomasa puede emplearse para otros fines de utilidad.



Debido a las necesidades actuales, en el cuidado del medio ambiente y la importancia del proceso de sanitización, se planteó la formulación de un sanitizante biodegradable, a base de peróxido de hidrógeno y ácido acético, los cuales se consideran con las características degradables adecuadas para no dejar residuos en las áreas y equipo de producción, evitando de esta forma un daño ecológico que pudiera ser irreparable.

Ante esto se resaltó la importancia de formular nuevos productos sanitizantes que permitan obtener un bajo nivel de residuos y alta capacidad biodegradable, siendo este el objeto de estudio del presente proyecto.

## **2. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA.**

### **2.1. EL PROCESO DE LIMPIEZA**

Actualmente durante la fabricación de un producto farmacéutico, no sólo se ha hecho necesario eliminar los residuos del producto que se encuentre presente, sino también eliminar los microorganismos patógenos del área de producción y del equipo, como es el caso de formas farmacéuticas estériles de pequeño volumen.

Para la industria farmacéutica como para los organismos regulatorios como, la Food and Drug Administration (F.D.A.) o la Secretaría de Salud (S.S.) es importante asegurar que el equipo se encuentre limpio de tal forma que el producto mantenga su inocuidad y calidad.

A este respecto, K.M. Jenkins y A. J. Vanderwieien (1), publicaron un documento donde asientan algunos criterios del proceso de limpieza. En él se presentan algunos puntos importantes que han alertado a la industria farmacéutica respecto al proceso de limpieza que se lleva a cabo en las áreas de producción enlistando una serie de situaciones a las cuales se les debe considerar con mayor atención, como es el seguimiento del proceso de limpieza, el proceso en sí, la limpieza del equipo, el sanitizante y las pruebas relacionadas a la evaluación del proceso. Con ello se logrará que el producto sea protegido de la contaminación cruzada de un anterior producto fabricado en un equipo que es destinado para diferentes productos. (2)

El objetivo de un proceso de limpieza se centra en: reducir los residuos de un producto por debajo de los límites establecidos de tal forma que no afecten la calidad y la inocuidad de otro producto fabricado en el mismo equipo que finalmente es lo que se persigue.

El proceso de limpieza y todos los factores que de alguna forma afectan los procesos realizados en un área aséptica son un factor importante en la industria farmacéutica, de ahí que la F.D.A manifieste su interés en algunas de sus publicaciones, haciendo referencia a algunos de los puntos críticos para realizar la validación del proceso de limpieza, por lo cual la sanitización se considera un factor importante directamente relacionado al método de limpieza.

Cada industria lleva a cabo un procedimiento de limpieza diferente en cada una de sus áreas de producción; por ello es importante considerar que el método de limpieza que se implemente se verá limitado por el tipo de material existente, el cual deberá ser removido de la superficie del equipo y del área, además, los límites de residuos utilizados son relacionados a la toxicidad / potencia de todo aquello que tenga que ver con el proceso de limpieza y el proceso de producción. Por que la potencia que un fármaco presenta y que puede ser altamente tóxico puede ocasionar efectos adversos en cuestión de minutos; de ahí la importancia del método de limpieza y de los métodos de análisis utilizados en la detección de residuos, asegurando que los contaminantes han sido completamente removidos.(3)

Se sugiere que el programa de limpieza cubra con un estandar y/o criterio de aceptación, así como establecer la frecuencia con que se deben realizar las pruebas y límites máximos permisibles de residuos. Además, de revisiones periódicas o auditorias de validación. (2)

## **ESTERILIZACIÓN**

Cabe mencionar que además de realizar un proceso de limpieza que incluye: métodos de limpieza, programas de limpieza, sanitización y desde luego el uso de sanitizantes, en un área aséptica, también es importante controlar la esterilidad, la cual involucra la eliminación de todo tipo de forma viva de microorganismos. Para poder asegurar la

esterilidad de un producto farmacéutico, es necesario cubrir una serie de requisitos, los cuales parten desde las áreas de producción, equipo, hasta el proceso de fabricación. Todo esto debe asegurar la esterilidad e inocuidad del producto. Por ello la sanitización y la esterilización, como procesos se encuentran estrechamente vinculados en los procesos de fabricación y en el proceso de limpieza. La sanitización reduce la carga microbiana presente lo que contribuye finalmente a la esterilización. Debido a este estrecho vínculo es necesario mencionar dos métodos de esterilización que actualmente se emplean en la industria farmacéutica, los cuales son: La Esterilización Terminal y El Proceso Aséptico. Ambos pueden ser usados en forma combinada o por separado.

### **Esterilización Terminal y El Proceso Aséptico**

La Esterilización Terminal se define como un paso del proceso utilizado para asegurar un SAL menor de  $10^{-6}$  UFC después de que el producto pasa a su contenedor. Es importante mencionar que un SAL es el nivel de esterilidad asegurado (SAL) y este se define como la probabilidad máxima de la unidad del mismo producto después de su exposición en el proceso hasta su esterilidad.(2)

El método clásico de conseguir la Esterilización Terminal, se realiza utilizando calor lo que provee letalidad, obteniendo como resultado la esterilidad. Sin embargo, no se garantiza que el producto no se vea afectado por las condiciones drásticas a las que se ve sometido en este tipo de métodos, por lo que se ha tratado de encontrar nuevas técnicas, que sean disponibles y prácticas, de tal forma que no afecten al producto, permitiendo reducir los costos de producción.

Todos los métodos de Esterilización Terminal requieren de altas cantidades de energía. Esta alta cantidad de energía y el resultado de la esterilización son inherentes a los cambios que ocurren en los materiales y el producto. Estos factores son los primeros que limitan el uso de la esterilización terminal.

La experiencia ha demostrado, la necesidad de controlar todos aquellos factores que de alguna manera pudieran afectar la realización del método.

El Proceso Aséptico generalmente es usado cuando el producto o los componentes del empaque son termolábiles, por lo que no pueden ser sometidos a condiciones tales como las que se requieren en La Esterilización Terminal. El Proceso Aséptico se define como el procedimiento por el cual el producto es esterilizado por separado y es empacado en su material de empaque previamente estéril con un estricto control del medio ambiente.

La importancia de los Procesos Asépticos y de la Esterilización Terminal en un producto, es mantener la inocuidad, eficacia y la esterilidad del mismo; de tal forma que se tenga la seguridad de que el medicamento no ocasionara daños al organismo, sólo actuara para lo que fue creado.

De ahí que White (4), mencione las ventajas y desventajas que se presentan al utilizar cualquiera de los dos métodos, resumiendo que el objetivo de emplear un método u otro, es optimizar los atributos y minimizar las desventajas del proceso.

Ambos métodos actualmente son utilizados por la industria farmacéutica para asegurar la calidad del producto.

Preservar la esterilidad y asegurar los niveles de esterilidad son puntos importantes para asegurar que el medicamento no estará contaminado al ser administrado al paciente.(5)

## **2.2.SANITIZACIÓN**

La sanitización es una compleja tecnología, que se encuentra relacionada con el uso de sanitizantes y agentes germicidas que de alguna forma contribuyen a obtener un área aséptica. La sanitización forma parte de los procesos de limpieza los cuales ayudan a que un producto sirva para lo que fue creado.

### **2.2.1. SANITIZANTES Y AGENTES GERMICIDAS**

#### **2.2.1.1. DEFINICIONES**

Existen una serie de términos empleados relacionados con la actividad de un agente químico sobre un microorganismo los cuales se definen a continuación:

1.Antibiótico: Es una sustancia que producen ciertos microorganismos, en soluciones diluidas, pueden eliminar o prevenir el crecimiento de los microorganismos.(12)

2.Bacteriostático: Que tiene la propiedad de inhibir la multiplicación bacteriana; esta se reanuda en cuanto se retira el agente.(12)

3.Bactericida: Que tiene la propiedad de matar a las bacterias. Esta acción es irreversible; esto es, que una vez retirado el agente el microorganismo no reanuda su multiplicación. (12)

4.Biocida: Agente que elimina organismos vivos, incluyendo algunos tipos de esporas. Por lo mismo puede considerarse un agente esterilizante. (6)

5.Biostato: Su acción es similar a la de un agente bacteriostático, pero previene el crecimiento de todo organismo vivo. (12)

6.Desinfectante: Es un agente químico que mata a las bacterias y a otros microorganismos. El proceso de desinfección no es instantáneo, sino que ocurre gradualmente; en él, el número de organismos muertos por unidad de tiempo es mayor al principio y va siendo cada vez más pequeño conforme aumenta el tiempo de exposición; los términos germicida y bactericida son sinónimos de desinfectante. Un desinfectante es también requerido por su acción la cual debe ejercer en un período corto de tiempo, generalmente 10 min. El término desinfectante se aplica sólo a aquellos agentes que actúan sobre objetos inanimados. (6)(12)

7.Antiséptico: Es una sustancia que impide, detiene o inhibe el desarrollo de microorganismos, sin necesidad de matarlos. Antibiótico y bacteriostático caen dentro de la definición de antiséptico, pero con matices diferentes.(6)

Algunos autores prefieren definir antiséptico como aquella sustancia bactericida o bacteriostática que pueda ser aplicada para que ejerza su acción sobre los microorganismos que existan en los tejidos vivos. (6)(12)

8.Asepsia: Se entiende por asepsia todas las precauciones que se toman para impedir el acceso de microorganismos a los materiales o tejidos. Caracterizado por la falta de microorganismos patógenos .(12)

**9.Séptico:** Caracterizado por la presencia de microorganismos patógenos en el tejido vivo. (6)

**10.Esterilización:** La destrucción o eliminación completa de todas las formas vivas de microorganismos. Exento de vida de cualquier clase. (6)(12)

**11.Conservador:** Agente que ayuda a eliminar la acción degradante de los materiales. Usualmente es asociado con la prevención del deterioro biológico.(6)

**12.Sanitizante:** Usualmente se define como un agente químico que elimina la contaminación microbiana que se encuentra en forma de células vegetativas. Es un agente que reduce considerablemente la carga microbiana, es asociado a operaciones de limpieza en objetos inanimados. (6)(8)(12)

Cabe mencionar que un sanitizante no es específicamente un esterilizante. Un esterilizante se define como un agente químico que destruye o elimina todas las formas de microorganismos vivos en el medio ambiente, originando un medio estéril. (8)

Existen algunos puntos respecto a los sanitizantes los cuales son importantes de mencionar, por ejemplo; la concentración efectiva para un tiempo específico sólo se obtiene con condiciones apropiadas. Entre menos materia orgánica exista, mejor es el trabajo del sanitizante, para evaluar su eficacia se requiere realizar un trabajo microbiológico, en el cual se toma en cuenta el tiempo de contacto entre el sanitizante y el microorganismo. (6) Aunque no solo el tiempo de contacto es importante en el efecto bactericida que presenta el sanitizante, sino también, la concentración, temperatura, pH, etc. (8)



Por definición algunos autores consideran un sanitizante como un desinfectante, ya que su empleo se lleva a cabo en procesos de limpieza. (6)(8)(12)

#### **2.2.1.2. CLASIFICACIÓN:**

Los desinfectantes y/o sanitizantes incluyen una amplia gama de compuestos y agentes químicos; (13)

1. Sales de metales pesados:  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{KMnO}_4$ , etc.
2. Halógenos: cloro, bromo, yodo, y sus sales.
3. Aldehidos y ácidos: Formaldehído, Ácido nítrico, Ácido sulfúrico, Ácido bórico, Ácido salicílico, etc.
4. Compuestos orgánicos: derivados del alquitran de hulla como cresol, tricresol, alcanfor, creosota, ácido fénico, etc.
5. Agentes oxidantes: peróxido de hidrógeno, perborato de sodio, permanganato de potasio, cloruro de calcio.
6. Agentes gaseosos: formaldehído, bioxido de azufre, ácido cianhídrico y los halógenos.
7. Alcalis:  $\text{KOH}$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{LiOH}$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{Ba(OH)}_2$ .
8. Jabones
9. Aerosoles
10. Colorantes: Los colorantes en bacteriología tienen diversas aplicaciones, entre ellas se usan para hacer visibles a los microorganismos, mostrar su estructura, revelar su naturaleza química, influir en su crecimiento y aislamiento provocando una bacteriostasis selectiva. La incorporación de un colorante adecuado en un medio lo vuelve selectivo; por ejemplo, favorece el crecimiento de algunas especies de bacterias e inhibe el de otras. En general esta especificidad guarda buena correlación con la reacción de Gram; los gérmenes gramnegativos en su mayor parte son mucho menos sensibles a los colorantes que los grampositivos. La actividad

de estos compuestos se afecta por el pH, la toxicidad de los colorantes ácidos aumentan con la acidez, y la de los básicos con la alcalinidad.

Existe otra clasificación, en donde se engloban cuatro grandes grupos de acuerdo a la composición del sanitizante (8):

- a) Compuestos a base de cloruro
- b) Ioduros
- c) Compuestos a base de amonio cuaternario.
- d) Agentes ácido aniónicos.

### **2.2.1.3. MECANISMO DE ACCIÓN**

Los agentes químicos ejercen su acción de acuerdo a diferentes mecanismos de acción, de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas.

- **Daño al DNA**

Los agentes alquilantes y otros compuestos, reaccionan en forma covalente con las bases púricas y pirimidínicas para formar secciones demasiado próximas de DNA o enlaces cruzados en la misma tira. Las lesiones ocasionadas por agentes químicos provocan, en particular la interferencia en la replicación del DNA. (12)

- **Desnaturalización de Proteínas**

Las proteínas existen plegadas en forma tridimensional, unidas por enlaces disulfuro covalentes intramoleculares, y por enlaces no covalentes como hidrofóbos, iónicos y de hidrógeno; que originan esta estructura terciaria de la proteína. Algunos agentes químicos ocasionan la fragmentación de este acomodo proteico, interfiriendo en los enlaces covalentes y no covalentes, de tal forma que se pierde la estructura terciaria, esto se denomina desnaturalización de la proteína.(9)

- **Rotura de la Membrana Celular**

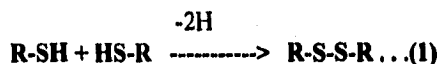
La superficie externa de cada célula esta circunscrita por una cubierta delicada, elástica, parte integral y funcional de la misma, denominada membrana celular; la cual actúa como una barrera selectiva dejando pasar algunos solutos a través de ella y excluyendo otros. La membrana es también sitio de acción de muchas enzimas, las cuales intervienen en forma activa en la biosíntesis de los componentes de la envoltura celular.

El equilibrio en el que la membrana mantiene la concentración de solutos dentro y fuera de ella origina el buen funcionamiento de la misma, por lo tanto al alterar este equilibrio, se alteran también las propiedades físicas y químicas de la membrana, impidiendo su función normal, matando o inhibiendo en esta forma a la célula.

La pared celular actúa como una estructura de sujeción, protegiendo a la célula contra la lisis osmótica. De esta forma los agentes químicos que destruyen la pared, o impiden su síntesis normal pueden ocasionar la lisis de la célula. (12)(14)

- **Eliminación de Grupos Sulfhidrilo Libres.**

Las proteínas enzimáticas que contienen cisteína, tienen cadenas laterales que terminan en grupos sulfhidrilo, ecuación (1). La coenzima A, requerida para la transferencia del grupo acilo, contiene un grupo sulfhidrilo. Tales enzimas y coenzimas no pueden funcionar a menos que los grupos sulfhidrilos permanezcan libres y reducidos. Los agentes oxidantes, interfieren en el metabolismo ligando grupos sulfhidrilo libres para dar uniones disulfuro.



Existen en la célula muchas enzimas que contienen grupos sulfhidrilo; por consiguiente, los agentes oxidantes y los metales pesados causan un daño considerable. (12)

- **Antagonismo Químico**

La interferencia de un agente químico con la relación entre una enzima específica con su sustrato se conoce como antagonismo químico. "El antagonismo actúa por combinación con alguna parte de la haloenzima ( ya sea apoenzima proteínica, con el activador mineral o con la coenzima ) de modo que impide la unión del sustrato normal. Un antagonista se combina con una enzima por su afinidad química respecto a un sitio esencial de esa enzima. Las enzimas realizan su actividad catalítica en virtud de su afinidad con los sustratos naturales; de ahí que un compuesto que estructuralmente se asemeja a un sustrato con los aspectos esenciales, pueda tener también afinidad con la enzima. Si esta afinidad es lo suficientemente grande, el

“análogo” desplazará al sustrato normal de la enzima e impedirá que tenga la reacción adecuada”.

La importancia de que un agente químico funcione como antagonista frente a una enzima específica, radica en que muchas de estas enzimas son indispensables en los procesos que suministran energía y en aquellos procesos biosintéticos. (12)

#### **2.2.1.4. CARACTERÍSTICAS IDEALES DE UN SANITIZANTE.**

Los aspectos que debe cubrir un sanitizante para ser considerado un producto ideal son los siguientes:

- Alto coeficiente de desinfección.
- Estabilidad.
- Solubilidad.
- No tóxico para el hombre y los animales.
- No corrosivo y sin acción decolorante.
- Alto poder de penetración.
- Barato.
- Acción detergente.
- De fácil aplicación y adquisición.
- No debe dejar residuos.

Si un sanitizante cubre con todas estas características será considerado un sanitizante ideal. (15)(18)

#### **2.2.1.5. COEFICIENTE FENÓLICO.**

Al comprar un desinfectante y/o sanitizante, cualquiera que este sea; es importante comprobar la eficacia del mismo de manera periódica. Por lo que se han implementado una serie de métodos, los

cuales dependiendo de las características de los componentes activos del sanitizante, son empleados.

El más utilizado es el método del coeficiente fenólico en el cual la eficacia relativa de un desinfectante se determina por su capacidad de matar a un organismo de prueba en comparación con la del ácido fénico en las mismas condiciones. La prueba F.D.A. para la determinación del coeficiente fenólico se ejecuta realizando una serie de diluciones del desinfectante (sanitizante) y del fenol, las cuales son sometidas a un grupo de microorganismos previamente determinados, realizando muestreos a intervalos de 5, 10 y 15 min e inoculando en tubos con caldo estéril reportando los resultados de crecimiento (+) y no crecimiento (-) después de un período de incubación de 48 hrs a 37°C.

(8)(15)

Los resultados se presentan de acuerdo al ejemplo de la tabla I.

Ejemplo:

FENOL				DESINFECTANTE			
MINUTOS DE EXPOSICIÓN				MINUTOS DE EXPOSICIÓN			
DIL.	5	10	15	DIL.	5	10	15
1:00	-	-	-	1:150	-	-	-
1:50	-	-	-	1:175	-	-	-
1:100	+	-	-	1:200	-	-	-
1:110	+	+	+	1:250	+	-	-
1:120	+	+	+	1:375	+	+	+
1:130	+	+	+	1:500	+	+	+

TABLA I. RESULTADOS DE EFICACIA DEL FENOL Y DEL DESINFECTANTE PRUEBA.

El coeficiente fenólico se calcula por la relación entre la mayor dilución del germicida ensayado que mata al organismo de prueba en

10 min pero no en 5 min y la mayor dilución del fenol que muestre los mismos resultados.

En el caso expuesto en el ejemplo, el coeficiente fenólico sería: 250/100 o 2.5.

En relación con la determinación del coeficiente fenólico, es necesario mencionar algunas limitaciones y ciertas advertencias:

1. Cuando se proyecta la prueba, para obtener los resultados más seguros sólo se debe hacer con compuestos químicamente relacionados con el fenol.
2. Hay que seguir exactamente el procedimiento y registrar el método empleado y los resultados obtenidos.
3. La prueba no revela la toxicidad del germicida para los tejidos vivos.
4. El desinfectante probado tiene que ser completamente soluble en agua o miscible con agua.

#### **2.2.8. TOXICIDAD DE SANITIZANTES Y DETECCION DE RESIDUOS**

Es necesario considerar que no sólo la eficacia de un sanitizante es importante; también hay que tomar en cuenta el daño que pueden provocar al producto terminado debido a su composición, de ahí la importancia de conocer químicamente los activos del mismo para saber si estos ocasionan degradación del activo y/o excipientes de un determinado producto farmacéutico.

Lee E., Kirsh, et al (11), hace referencia a cada uno de estos aspectos, donde señala su preocupación tratando de probar de manera experimental si la composición de los diferentes sanitizantes comerciales dañan o degradan al producto. El medicamento a probar tiene como activos proteínas y la forma farmacéutica que se le da es en frasco vial. Cada uno de los sanitizantes comerciales es sometido a un proceso en el cual se coloca la muestra del sanitizante junto al medicamento en un vial, con el fin de probar si el sanitizante ejerce algún efecto sobre el activo durante todo el proceso de fabricación, lo que implica la liofilización del polvo hasta el sellado del producto en el frasco vial.

Como el medicamento contiene proteínas es necesario seguir la degradación de las mismas, para ello se emplean tres métodos para la caracterización de las proteínas.

- 1) *Cromatografía de exclusión con fase móvil acuosa*: cuantifica proteína total.
- 2) *Cromatografía de exclusión con fase móvil (Mezcla de solventes)*: cuantifica los agregados disociables (agregados covalentes).
- 3) *HPLC fase reversa*: detecta el cambio covalente de la proteína monomérica.

La mayoría de los sanitizantes tienen el problema de que suelen presentar por su composición; formación de un precipitado lo que provoca formación de residuos difíciles de remover provocando con esto la contaminación del producto y la alteración de este en cuanto a su eficacia, si de alguna forma influye con el proceso degradativo del activo. Como en el caso del peróxido de hidrógeno, este induce la oxidación de proteínas, como cisteína, metionina, triptófano, histidina y tirosina.

De ahí la importancia de realizar estudios con los sanitizantes y los activos, de tal manera que pueda preveer el daño y de esta forma



darle pronta solución. Además al utilizar un sanitizante en la limpieza de equipo en un proceso de producción se debe procurar disminuir la peligrosa carga de contaminación, produciendo la mínima cantidad de residuos tóxicos removibles. (8)

Existe otra prueba de evaluación de un sanitizante, en la cual se observa el daño al tejido. En ella, el sanitizante se ensaya para determinar los efectos sobre el desarrollo del tejido cardiaco de embrión de pollo vivo. El índice de toxicidad se obtiene del cálculo de la relación entre la más alta dilución germicida requerida para matar el tejido en 10 min y la mayor dilución requerida para matar al microorganismo de prueba en el mismo periodo bajo las mismas condiciones.(5)

### **2.3. CUARTO LIMPIO**

Todos los procesos de esterilización e incluyendo el proceso de limpieza se llevan a cabo en una de las áreas especializadas que se encuentra dentro del área de producción que se encarga precisamente de la fabricación de productos estériles y a la cual debe prestarse mucha atención con respecto a mantenerla libre de contaminación, dicha área es el Cuarto Limpio. (5)

Esta área es parte integral del Bloque para la preparación de productos estériles y puede definirse como una zona delimitada por paredes, techo, piso y accesos en el cual se tiene un estricto control sobre la cantidad de material particulado (microbiológico o no ) presente, así como las condiciones de temperatura, humedad relativa y sobre presión, requeridas para los procesos que se realicen dentro de él. (5) (6)

El término Bloque del cual forma parte el Cuarto Limpio se define como el conjunto de zonas de una planta farmacéutica destinado a la preparación y envase de medicamentos estériles que deben

administrarse al paciente y que no pueden ser esterilizados en sus envases primarios finales. Abarcando también aquellos medicamentos cuya esterilidad debe conservarse hasta antes de su administración.

En el centro del Bloque existe el Cuarto Limpio, en donde se efectúa el envase y el cerrado de los medicamentos a procesar, o bien operaciones tales como el mezclado, la liofilización u otras.

Como en toda área de producción existen una serie de requerimientos los cuales van enfocados en particular al Cuarto Limpio, y varían de acuerdo con las operaciones que se lleven a cabo en ellos, por lo que son requerimientos de operación y construcción. (6)

Actualmente la F.D.A. ha establecido una serie de requisitos los cuales aseguran que un medicamento cumpla con todos los controles de calidad, de tal forma que se asegure su eficacia, incluyendo los requisitos que las áreas de producción como el Cuarto Limpio deben cumplir implementando programas de inspección para un mejor control.

Tales programas, especifican las áreas y sistemas que más son revisados durante una inspección de operaciones de productos parenterales de pequeño volumen. Entre los requisitos que se deben cubrir durante la inspección son: el área de inspección debe contar con identificación, se incluye el flujo de materiales, equipo, pirógenos, material particulado presente en el área, control ambiental, sistema de agua, HVAC, sistemas de drenaje y generación de vapor, así también como su diseño. Validación del ciclo de esterilización (calor seco, calor húmedo, o EtO), proceso aséptico, proceso de limpieza (donde se incluye; la sanitización, tipo de sanitizantes, ciclado de sanitizantes, etc), filtración y liofilización. (7)

Por esta razón en los procesos de validación, los sanitizantes juegan un papel muy importante debido a que muchas de las estrategias implementadas para realizar la validación de procesos estériles, involucran la elección adecuada del sanitizante, a utilizar tomando en

cuenta la toxicidad y los residuos que estos pueden dejar en los productos así como los métodos que se utilizan en la detección de los mismos. (2)(8)(9)

### **2.3.1. USO DE SANITIZANTES.**

Para el adecuado funcionamiento operativo de un Cuarto Limpio, e independientemente del mantenimiento y de las condiciones establecidas previamente, es necesario realizar sanitizaciones periódicas que coadyuven a preservar las condiciones asépticas en las cuales se operan los diversos procesos estériles. (8)

La adecuada sanitización de las áreas debe ser realizada de tal manera que proteja debidamente todas las superficies del Cuarto Limpio; las superficies externas del equipo y todo aquello que se requiera para el trabajo normal que debe encontrarse dentro del área. (9)

La sanitización va enfocada prioritariamente al ataque de los posibles microorganismos que puedan encontrarse depositados o adheridos a las partes anteriormente mencionadas.

### **2.3.2. CICLADO DE LA SANITIZACIÓN.**

La sanitización se realiza utilizando agentes químicos de diverso origen, pero que tengan siempre un poder bactericida demostrado. Dado que muchos microorganismos pueden crear resistencia a muchos de los sanitizantes químicos; es recomendable el ciclado de los mismos. En el ciclado se pueden usar alternadamente agentes químicos que utilicen radicales químicos distintos para ejercer su acción, ya que esto dificulta la aparición de microorganismos resistentes.

Se han realizado otras técnicas de ciclado, por ejemplo acidificar y alcalinizar al agente químico, de tal forma que durante el estudio realizado se espere que cambiando el pH al medio se pueda alterar el metabolismo del microorganismo, inhibiendo de esta forma su expansión. (16)

### **Registro:**

Es necesario documentar tanto el ciclado de los agentes químicos como la periodicidad con que se realiza este procedimiento; de tal forma que sea fácil detectar las fuentes de contaminación (debida a residuos de sanitizante o por el tiempo de exposición del sanitizante con el área ) así como la pronta identificación del microorganismo que más persiste en el área.

Muchos de los agentes sanitizantes, se presentan en forma líquida, lo cual permite que sean aplicados por vaporización o por frotamiento, si es este el caso debe prestarse atención al tipo de paño y/o aplicador que se utilice; ya que no deben liberar partículas que puedan ocasionar problemas de contaminación. (9)

### **Evaluación de Esterilidad y Sanitización.**

Se pueden emplear algunas de las siguientes técnicas:

- Exposición periódica de cajas petri conteniendo medios de cultivo específicos para bacterias y hongos.(5)
- Muestreo del aire mediante equipo mecánico que permita determinar la contaminación en función de la cantidad de aire muestreado. (5)
- Muestreo de paredes, techos y pisos mediante hisopos estériles humedecidos que posteriormente se someten a incubación. (3)

## **2.4. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO**

### **2.4.1 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS:**

Es un líquido incoloro, pesado que en estado anhidro presenta las siguientes propiedades físicas; p.e. de 1.46, p.f. -2°C, p. eb. 158°C, PM: 34.02, es insoluble en alcohol, agua y éter de petróleo; presenta descomposición por muchos solventes orgánicos, es fundamentalmente inestable; la descomposición es lenta.(17)

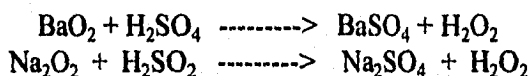
El peróxido de hidrógeno como sanitizante es comunmente utilizado en soluciones que varían 3 al 10 % de su concentración. En concentraciones del 10 % es usado para eliminar materia orgánica de filtros UF; algunos recomiendan diluir las soluciones a 100 y 200 ppm. La ventaja de utilizar el peróxido de hidrógeno es que tiene un tiempo de vida media aproximadamente de 7 horas, descomponiéndose a moléculas inofensivas fáciles de remover. Una solución al 30 % de peróxido de hidrógeno en agua, se descompone en 36 hrs, particularmente bajo la influencia de rayos U.V. Las soluciones al 0.1 % de peróxido de hidrógeno no son efectivas para eliminar materia orgánica. Las concentraciones / tiempo equivalentes efectivas del peróxido de hidrógeno reportadas en la literatura (5) son las siguientes: 3 % / 1 hr, 10 % /10 min, y para 1% / 48 hrs. Se acelera la descomposición del peróxido de hidrógeno, en presencia de hipoclorito de sodio hasta la formación de agua y oxígeno. Sin embargo la acción oxidativa del peróxido de hidrógeno sobre moléculas orgánicas puede producir entidades ionizables como ácidos carboxílicos y varios radicales libres de larga vida, los cuales aceleran la descomposición hacia la formación de dióxido de carbono y agua.(5)

En su forma concentrada, el peróxido de hidrógeno puede explotar violentamente si no se maneja con cuidado. Se descompone en agua y oxígeno en una reacción exotérmica:



Cuando esta reacción se verifica en solución acuosa se puede usar como método de laboratorio para la preparación de oxígeno.

La variedad casera común de peróxido de hidrógeno es una solución acuosa al 3% que no es peligrosa debido a la dilución. Se pueden obtener soluciones acuosas diluidas de peróxido de hidrógeno tratando peróxido de bario o peróxido de sodio con ácidos diluidos:



El peróxido de hidrógeno se usa como oxidante y como blanqueador. En su forma concentrada de 90% o más, se usa como agente oxidante para cohetes y explosivos. (18)

#### **2.4.2. MONOGRAFÍA:**

**HIDROGENO, PERÓXIDO DE, SOLUCIÓN DE**

**TECNICAS DESCRITAS POR  
FARMACOPEA. (19)**

*Descripción*  
*Ensayos de identidad*

Las técnicas serán descritas en el apartado que corresponde al

*Densidad* material y métodos.  
*Acidez*  
*Residuo no volátil*  
*Metales pesados*  
*Límite de conservadores*  
*Valoración*

## **2.5. ACIDO ACÉTICO**

### **2.5.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS:**

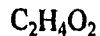
Es el ácido carboxílico más comercial e importante, se prepara por la oxidación en aire de acetaldehído con acetato de cobalto o de manganeso (II) como catalizador:



El ácido se vende en forma pura como ácido acético glacial, llamado así debido a que se congela en forma de un sólido parecido al hielo en los días muy fríos. El punto de fusión es de 16.6 °C. Se usa en la fabricación de acetato de celulosa, plomo blanco para pinturas, plásticos, perfumes, colorantes y medicamentos. (18)

### 2.5.2. MONOGRAFÍA:

ACÉTICO, ACIDO.



#### TECNICAS DESCRITAS POR FARMACOPEA. (19)

*Descripción*

*Solubilidad*

*Densidad*

*Ensayos de identidad*

*Residuo no volátil*

*Cloruros*

*Metales pesados*

*Sustancias facilmente oxidables*

*Sustancias relacionadas*

*Acido fórmico e impurezas oxidables*

*Valoración*

*Conservación*

Las técnicas serán descritas en el apartado que corresponde al material y métodos.

### 2.6. CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS DE PRUEBA PARA EL SANITIZANTE.

Se deben conocer algunas de las características más importantes de los microorganismos, como la forma de sus colonias, patología, etc., de tal forma que permita evaluar el comportamiento que el microorganismo presente al estar en contacto con el sanitizante.



### 2.6.1. MORFOLOGÍA DE LA COLONIA BACTERIANA.

Las bacterias se multiplican rápidamente y forman masas macroscópicas visibles de crecimiento cuando se les inocula en medios adecuados que contengan un 2% de agar y se incuban de 18 a 48 hrs en una atmósfera favorable. (13)

Las características macroscópicas de las colonias ayudan a la identificación, dado que las colonias de distintos microorganismos varían en tamaño, forma, color, olor, textura y grado de adherencia al medio.

Las características serológicas de una bacteria a menudo se correlacionan con el aspecto mucoide ( M ), liso ( L ), o rugosa ( R ) de una colonia.

Las colonias lisas, muestran un aspecto de homogeneidad y textura uniforme, sin parecer tan líquidas como las colonias mucoides.

Las bacterias que forman colonias L, se denominan morfológicamente lisas (es decir, formas L). Las formas L, son características de microorganismos de tipo salvaje recién aislados, tales como las enterobacterias gramnegativas (*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Serratia* y especies de *Proteus* ).

Las características de las colonias de acuerdo a:

- Consistencia: la colonia puede ser butirosa, mucoide, viscosa, o friable (que se desmorone).
- Transparencia: la colonia puede ser transparente, translúcida u opaca.

- **Pigmentación:** los diferentes cultivos pueden producir todos los matices de los colores. También es frecuente que cambie la producción de pigmento bajo condiciones variables.

#### **2.6.1.1. SALMONELLA**

Se trata de bastoncillos móviles que fermentan de manera característica la glucosa y la manosa sin producir gas, pero no fermentan la lactosa ni la sacarosa. La mayor parte de las *salmonellas* producen ácido sulfhídrico.

A menudo son patógenas para el hombre y los animales cuando se ingieren.

Se transmiten desde los animales y los productos de estos hacia el hombre, en el cual producen enteritis, infección general y fiebre intestinal. (12)

#### **Morfología:**

La longitud de las diversas especies varía. La mayor parte, son móviles y tienen flagelos peritricosos.

Estos microorganismos crecen con facilidad en medios sencillos; forman ácido y a veces gas a partir de glucosa y manosa. Sobreviven a la congelación en el agua durante períodos prolongados. Son resistentes a ciertos productos químicos (por ejemplo, verde brillante, tetraciónato de sodio y desoxiglicolato de sodio) que inhiben a otras bacterias intestinales. (12)

Las *salmonellas* poseen diversos antígenos O ( a partir de un total de más de 60 ) y diferentes antígenos H en una o ambas fases.

La dosis infecciosa media para producir infección clínica o subclínica en el hombre es de  $10^5$  a  $10^8$  *salmonellas*.

Las *salmonellas* producen tres tipos principales de enfermedad: Fiebres intestinales, Septicemia y Enterocolitis.

Deben aplicarse medidas sanitarias para prevenir la contaminación de los alimentos y agua.

#### **2.6.1.2. ESCHERICHIA:**

Las cepas de *Escherichia coli* que causan enfermedad se diferencian de las no patógenas por las pruebas de : A) si son virulentas en animales o en modelos de infección "in vitro" y B) si su constitución genética les permite causar enfermedades. (12)

*Escherichia coli* y muchas otras bacterias intestinales, son miembros de la flora intestinal normal. Las bacterias se vuelven patógenas sólo cuando llegan a los tejidos que están fuera del tubo intestinal en particular las vías urinarias y biliares. Cuando son insuficientes las defensas normales del huésped, en particular al principio de la infancia y durante la senectud, durante las etapas terminales de otras enfermedades, las bacterias pueden llegar a la sangre y producir sepsis. Durante el período neonatal, la gran sensibilidad a la sepsis por *Escherichia coli* puede ser causada por ausencia de anticuerpos IgM bactericidas.

#### **Morfología:**

Las enterobacterias son bastoncillos gramnegativos cortos que pueden formar cadenas. Se observa morfología típica en el crecimiento

sobre medios sólidos "in vitro", pero esta es muy variable en las muestras clínicas.

*Escherichia coli* y la mayor parte de todas las bacterias intestinales forman colonias circulares, convexas y lisas con bordes definidos.

Algunas cepas de *Escherichia coli* producen hemólisis en gelosa sangre. *Escherichia coli* produce de manera típica pruebas positivas a indol, descarboxilasa de la lisina y fermentación de manitol, lo mismo que gas a partir de la glucosa.

El microorganismo aislado de la orina se puede identificar como *Escherichia coli* por que produce hemólisis en agar sangre, morfología típica de las colonias con un brillo metálico en los medios diferenciales y prueba de mancha del indol positiva. (13)

#### **Patogenia y datos clínicos:**

*Escherichia coli* es la causa más común de infección de las vías urinarias, y constituye cerca del 90 % de las primeras infecciones de estas vías en mujeres jóvenes. Los síntomas y signos consisten en micción frecuente, disuria, hematuria y a veces piuria. La infección de la parte alta de las vías respiratorias se acompaña de dolor en el flanco. Ninguno de estos síntomas es específico de infección por *Escherichia coli*.(13)

### 2.6.1.3. PSEUDOMONA:

La especie de *Pseudomonas* se encuentra distribuida con amplitud en el suelo y el agua. A veces coloniza al ser humano, y es el principal agente patógeno del grupo para el mismo. *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra a menudo en números pequeños en la flora intestinal normal y en la piel del ser humano. (12)

#### **Morfología e identificación:**

- Microorganismos típicos: *Pseudomonas aeruginosa* es mótil y tiene forma de bastoncillo, mide aproximadamente 0.6 x 2 µm. Es una bacteria gramnegativa y se encuentra de manera aislada, en parejas y ocasionalmente en cadenas cortas.(12)
- Cultivo: *Pseudomonas aeruginosa* es un aerobio obligado que crece con facilidad en muchos tipos de medios de cultivo, y produce en ocasiones olor dulzón o de uvas. *Pseudomonas aeruginosa* forma colonias lisas con color verdoso fluorescente. Con frecuencia produce el pigmento azuloso no fluorescente procianina, que se difunde en el agar.

Muchas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* puede producir también pigmento fluorescente proverdina que imparte un color verdoso al agar. Algunas cepas producen el pigmento de color rojo oscuro piorrubina o el pigmento negro promelanina.

En un cultivo, *Pseudomonas aeruginosa* puede producir muchos tipos de colonias y da la impresión de un cultivo de especies mixtas de bacterias; puede tener también actividades bioquímicas y enzimáticas distintas y diversos patrones de sensibilidad a los agentes antimicrobianos.

### **Características del crecimiento:**

*Pseudomonas aeruginosa* crece bien a una temperatura que oscila entre 37 a 42°C; su crecimiento a 42°C ayuda a distinguirla de otras especies de Pseudomonas. Es positiva a la oxidasa. No fermenta los carbohidratos, pero muchas cepas oxidan la glucosa. *Pseudomonas aeruginosa* se puede tipificar por el inmunotipo lipopolisacárido y por la sensibilidad a la plocina (bacteriocina).

Muchas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* producen exotoxina A, causa de necrosis tisular y mortal para los animales cuando se inyecta en forma purificada. (12)(13)

### **Patogenia:**

*Pseudomonas aeruginosa* es patógena sólo cuando se introduce en zonas desprovistas de defensas normales. La bacteria se fija a las mucosas o a la piel y las coloniza, las invade de manera local y produce enfermedad general.(12)

### **Epidemiología y control:**

*Pseudomonas aeruginosa* es primordialmente un agente patógeno nosocomial. Como Pseudomonas, habita en ambientes húmedos, deberá prestarse atención especial a lavabos, jofainas, regaderas y bañeras, y a las otras zonas húmedas. (12)

#### **2.6.1.4. BACILLUS.**

Los microorganismos de éste género, son bacilos gampositivos, aerobios, grandes, que se agrupan formando cadenas. La mayoría de los miembros de este género son microorganismos saprófitos como *Bacillus subtilis* que prevalecen en el suelo, el agua., el aire y sobre vegetales.

Tales microorganismos pueden, en ocasiones, producir enfermedades en personas con alteraciones inmunitarias ( por ejemplo, meningitis, endocarditis, endoftalmitis, conjuntivitis o gastroenteritis aguda ). (12)

#### **Morfología e identificación:**

- Microorganismos típicos: las células típicas miden 1 X 3 a 4  $\mu\text{m}$ , tienen terminaciones cuadradas y están dispuestas en cadenas largas; las esporas se encuentran en el centro de estos bacilos inmóviles.
- Cultivo: las colonias son redondas y tienen apariencia de “vidrio despolido” a la luz transmitida. Frecuentemente los bacilos saprófitos; licuan el agar y el crecimiento en el mismo sembrado por picadura tienen apariencia de “pino invertido”.
- Características del crecimiento: los bacilos saprófitos utilizan fuentes de nitrógeno y de carbono sencillas, tanto para obtener energía como para el crecimiento. Las esporas son resistentes a los cambios del ambiente; soportando el calor seco y diversos desinfectantes químicos; persisten durante años en tierra seca. (12)

#### **Patogenia:**

Las esporas presentes en suelos contaminados penetran fácilmente a través de la piel o mucosas lesionadas, y raras veces por

aspiración a los pulmones. En el hombre, las escarificaciones o rasguños en la piel o la aspiración propician la infección.

Las esporas germinan en los tejidos en el sitio de entrada, y el crecimiento de las células vegetativas da lugar a la formación de un edema gelatinoso y congestión. Los bacilos se propagan por vía linfática a la sangre, multiplicándose libremente las bacterias en la misma y de manera breve en los tejidos antes y después de la muerte de un animal. (12)

#### **Patología:**

Los microorganismos proliferan en el sitio de entrada. Las cápsulas permanecen intactas y los microorganismos son rodeados por una gran cantidad de líquido proteináceo, que contiene muy pocos leucocitos; a partir de ahí, el germen se disemina con rapidez y llega a la sangre. (12)

#### **2.6.1.5. STAPHYLOCOCCUS:**

Los estafilococos son células esféricas grampositivas que suelen estar distribuidas en cúmulos irregulares a manera de racimo de uvas. Crecen en diferentes tipos de medios con facilidad, fermentan los carbohidratos y producen pigmentos.

Los estafilococos patógenos hemolizan la sangre, coagulan el plasma, producen diversas enzimas y toxinas extracelulares.

Desarrollan resistencia a muchos agentes antimicrobianos. El género *Staphylococcus* tiene por lo menos 20 especies. *Staphylococcus aureus* es un microorganismo positivo a la coagulasa y patógeno causante de muchas infecciones. (12)



### **Morfología e identificación:**

Los estafilococos son células esféricas de 1µm de diámetro distribuidas en cúmulos irregulares. En medios líquidos se encuentran cocos aislados, ya sea en pares, tetradas y en cadenas. Son microorganismos no móviles y no forman esporas. (13)

- Cultivo: los estafilococos crecen en diversos medios en condiciones aerobias o microaerófilas. Las colonias desarrolladas en medios sólidos son redondas, lisas, elevadas y resplandecientes. *S. aureus*, forma colonias de color gris a amarillo dorado intenso.
- Características del crecimiento: Los estafilococos muestran producción de catalasa, fermentan con lentitud muchos de los carbohidratos y producen ácido láctico. Estos microorganismos son resistentes a la desecación, el calor (soportan 50°C durante 30 min) y el cloruro de sodio al 9%.

### **Patogenia:**

La capacidad patógena de una cepa determinada de *Staphylococcus aureus* es el efecto combinado de los factores y las toxinas extracelulares simultáneamente con las propiedades invasoras de la cepa. En un extremo la enfermedad comienza con el envenenamiento de este microorganismo a los alimentos, que al ser ingeridos por el hombre ocasionan envenenamiento. Por otro lado se tiene bacteremia estafilocócica y abscesos diseminados por todos los órganos. (12)

### **Patología:**

El prototipo de la lesión estafilocócica es el furúnculo o cualquier otro absceso localizado.

La supuración focal (absceso) es típica de la infección por estafilococos. Desde cualquier foco los microorganismos pueden extenderse por los linfáticos y la sangre hacia otras partes del cuerpo.

Los estafilococos producen también enfermedad mediante elaboración de toxinas e infección invasora manifiesta. (12)(13)

### **Epidemiología y control:**

Los estafilococos son parásitos humanos que se encuentran en todas partes. Las fuentes principales de infección son las lesiones humanas que se diseminan al microorganismo. Aunque limpieza, higiene y tratamiento séptico de las lesiones pueden controlar la diseminación de los estafilococos. (12)

### **2.6.2. HONGOS**

Los hongos se consideran protistas no fotosintéticos que crecen como una masa de filamentos ramificados que se entrelazan ("hifas"), que se conoce como micelio. Las formas miceliales son llamadas mohos; algunos tipos como las levaduras, no forman micelios ; se reconocen como hongos por la naturaleza de sus procesos reproductivos sexuales.

Los hongos se clasifican tomando como base su reproducción sexual.

#### **2.6.2.1. ASPERGILLUS**

Las especies de *Aspergillus* son los mohos de crecimiento rápido. Debido a esto producen esporas pigmentadas, forman colonias con colores vívidos, que varían de azul a verde a amarillo. También pueden verse colonias blancas y negras puras.

El género se caracteriza por cadenas de conidias pequeñas u ovals a esféricas sostenidas en cadenas en las puntas de fiálides radialmente ubicadas sobre la superficie de ápice dilatado del conidióforo, denominado vesícula.

Las especies de *Aspergillus* están ampliamente distribuidas en la naturaleza donde actúan como saprófitos comunes en granos, hojas, suelo y desperdicios. Los conidios se dispersan rápidamente y el hombre más comunmente se infecta por inhalación de esporas transportadas por el aire.

Las enfermedades más comunes son aspergiloma, infección broncopulmonar, alergia y neumonía invasiva; las cuales son enfermedades pulmonares originadas por esta especie. (20)

### ***Aspergillus niger*:**

Este hongo comienza como una colonia blanca que puede volverse amarilla, pero rápidamente desarrolla un efecto de pimienta negra sobre la superficie, a medida que se producen conidias, que pueden volverse tan densas con el tiempo como para producir una mata negra. El reverso de la colonia es de color gamuza o crema.

Las hifas son tabicadas y los conidióforos son largos y lisos. La vesícula es esférica y da origen a grandes métulas y fiálides más pequeñas desde las cuales se producen conidias negras (20).

El género se caracteriza por cadenas de conidias pequeñas u ovals a esféricas sostenidas en cadenas en las puntas de fiáldes radialmente ubicadas sobre la superficie de ápice dilatado del conidióforo, denominado vesícula.

Las especies de *Aspergillus* están ampliamente distribuidas en la naturaleza donde actúan como saprófitos comunes en granos, hojas, suelo y desperdicios. Los conidios se dispersan rápidamente y el hombre más comunmente se infecta por inhalación de esporas transportadas por el aire.

Las enfermedades más comunes son aspergiloma, infección broncopulmonar, alergia y neumonía invasiva; las cuales son enfermedades pulmonares originadas por esta especie. (20)

#### ***Aspergillus niger*:**

Este hongo comienza como una colonia blanca que puede volverse amarilla, pero rápidamente desarrolla un efecto de pimienta negra sobre la superficie, a medida que se producen conidias, que pueden volverse tan densas con el tiempo como para producir una mata negra. El reverso de la colonia es de color gamuza o crema.

Las hifas son tabicadas y los conidióforos son largos y lisos. La vesícula es esférica y da origen a grandes métulas y fiáldes más pequeñas desde las cuales se producen conidias negras (20).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El proceso de sanitización de áreas asépticas es una compleja tecnología que no ha recibido la suficiente atención, en los procesos farmacéuticos y sobre todo el impacto que tiene dicho proceso sobre la calidad final del producto. (8)

Mucho se habla acerca del cuidado del medio ambiente, de minimizar la contaminación provocada por detergentes químicos o similares. De ahí la necesidad de realizar estudios para formular detergentes (sanitizantes) con propiedades biodegradables, eliminando así el problema de la contaminación y procurando además facilitar la remoción de residuos del mismo, en áreas y equipo de producción. (3)

Los residuos que un sanitizante deja en el equipo y/o en el área pueden provocar una contaminación cruzada y afectar de alguna forma al producto. Es importante controlar los factores de eliminación de los mismos y fijar límites de aceptación que no provoquen ningún tipo de contaminación en caso de que no sea fácil la remoción de los mismos. (2) (9)

Para facilitar la elección de un sanitizante deben tomarse en cuenta una serie de factores; entre los más importantes figuran; el costo, el tipo de material a utilizar, el tipo de área y la naturaleza del mismo.

De acuerdo a la composición del sanitizante se ha tratado de desarrollar métodos analíticos para la detección de residuos, y establecer los métodos de muestreo en las áreas y en el equipo. (21)

Por lo anterior en el presente proyecto se planteó la formulación de un sanitizante biodegradable, en base a compuestos que no dejen residuos en las áreas y equipo, partiendo de la etapa de preformulación y continuando con los estudios de formulación.

## **4. HIPOTESIS**

Tomando en cuenta los factores que afectan la eficacia y la potencia de un sanitizante, realizando estudios de preformulación, formulación y estabilidad; y considerando las propiedades biodegradables del peróxido de hidrógeno y del ácido acético se obtendrá un sanitizante con características germicidas adecuadas, el cual será altamente biodegradable.

## **5. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Desarrollar una formulación estable y económica para un sanitizante biodegradable.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- A) Realizar pruebas de preformulación para el peróxido de hidrógeno y el ácido acético como posibles agentes germicidas.
- B) Realizar pruebas de formulación en base a los resultados obtenidos en la etapa de preformulación.
- C) Evaluar las propiedades germicidas del sanitizante obtenido contra uno de los productos líderes en el mercado.
- D) Realizar un estudio de ciclaje para determinar la estabilidad física del sanitizante.

## 6. MATERIAL Y METODOS

### 6.1. MATERIAL

DESCRIPCION	CAPACIDAD (ml)	MARCA
Crisoles		
Pinzas para crisol		
Matraz Kjendal	500	Pyrex
Soporte universal		
Mechero Bunsen		
Mechero Fischer		
Desecador c/silica		
Vaso de precipitado	25,100, 250,y 500	Pyrex, Pka
Matraz Erlenmeyer	125,250, 1000	Pyrex
Matraz Erlenmeyer c/tapa rosca	250, 500	Pyrex
Matraz aforado	10, 50, 100, 250, y 1000	Pyrex
Tripie		
Tela de asbesto		
Pesa filtro		Pyrex
Probeta	25, 50, y 100	Pyrex, Pka
Pipeta volumétrica	1,2,y 5	Pka
Bureta	10, y 25	Pyrex
Pipeta graduada	1, 5, y 10	Pyrex
Tubos de ensaye c/tapa rosca		Pka
Gradilla		
Pinzas de tres dedos c/nuez		
Pinzas de disección		
Embudo de separación	25	Pyrex
Picnómetro	25	Pyrex
Tubos Nessler	25	Pyrex
Asa bacteriológica		
Jeringas estériles	1,3, y 5	Plastipak
Cajas petri	25	Pyrex, Pka
Frascos color ambar	25, 250,500,1000	



## 6.2. EQUIPO:

DESCRIPCION	CAPACIDAD (ml)	MARCA
Balanza analítica de un platillo		Metzler
Balanza electrónica		Metzler
Balanza granataria de un platillo		Ohaus
Autoclave		
Incubadora		Equipos para laboratorio S.A. de C.V.
Olla express		Ekco
Estufas de estabilidad		
Mufla		
Espectrofotometro U.V.-visible		Lambda 2. PerKin Elmer
Juego de Celdas para el espectrofotometro		Perkin Elmer
DESCRIPCION	CAPACIDAD (ml)	MARCA
Placa de calentamiento y agitación		
Vasos de acero inoxidable	250	

## 6.3. MATERIAL BIOLÓGICO:

### MICROORGANISMO

<u>Staphylococcus aureus</u>	ATCC 6538
<u>Salmonella typhimurium</u>	ATCC 6539
<u>Pseudomona aureuginosa</u>	ATCC 15442
<u>Bacillus subtilis</u>	
<u>Escherichia coli</u>	
<u>Aspergillus niger</u>	

**6.4 REACTIVOS:****DESCRIPCION**

Acido acético  
Peróxido de hidrógeno

Azul de metilo  
Etanol  
Hidróxido de amonio  
Fenofaleína  
Acido sulfúrico  
Hidróxido de sodio  
Permanganato de potasio  
Dicromato de potasio  
Oxalato de sodio  
Cloruro férrico  
Cloroformo  
Bicarbonato de potasio  
Yoduro de potasio  
Ácido clorhídrico  
Eter  
Bifalato de potasio  
Agar soya tripticaseína  
Agar soya tripticaseína  
Caldo soya tripticaseína  
Caldo lactosado  
Agar papa - dextrosa

**COLORANTES:**

Amarillo N°5  
Amarillo N°6  
Rojo N°6  
Color sunset yellow  
Verde de bromocresol

**SANITIZANTES:**

Sanitaizer  
Germizep  
GermiteK CT  
Trisanite

**MARCA**

Técnica Química S.A. de C.V. Lote: 268  
Laboratorios Laitz S.A de C.V. Lote:  
090689

Baker  
Merck  
Baker Analyzed Lote: 830459  
Baker  
Baker  
Baker  
Baker  
Baker  
Baker  
Baker  
Baker  
Baker  
Baker  
Merck  
Monterrey Lote: 003477  
Bioxon Lote: 1010851  
BBL Lote: 11043  
Bioxon Lote: 08611141  
Bioxon  
Bioxon

10ml/1 lt  
143 ml / 1lt  
60 ml / 1lt  
18 ml / 1lt

**AROMAS:**

Lima

Limón

Manzana

Durazno

Piña

Menta

## 6.5. METODOLOGÍA:

### 6.5.1. DIAGRAMA DE FLUJO

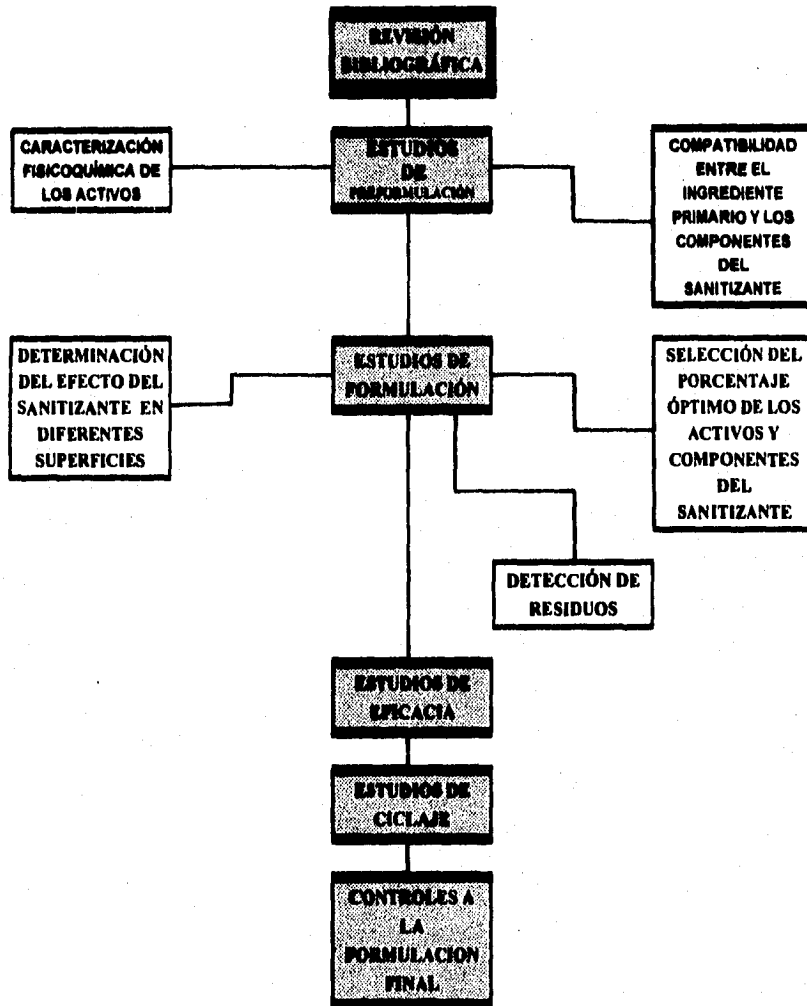


FIGURA I. DIAGRAMA DE FLUJO

## 6.5.2. ESTUDIOS DE PREFORMULACIÓN

### CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS ACTIVOS.

#### PERÓXIDO DE HIDRÓGENO:

- **ENSAYO DE IDENTIDAD.**

Se realizó el ensayo de identidad, preparando para ello una solución reactivo de dicromato de potasio, pesando de este 7.5 g disolviendo en agua y diluyendo con agua hasta un volumen de 100 ml. A una muestra de 1 ml de peróxido de hidrógeno y 10 ml de agua destilada, se agitaron junto con 2 ml de éter, posteriormente se agregó una gota de solución reactivo de dicromato de potasio. Se dejó reposar, realizando por duplicado la prueba.(19)

- **DENSIDAD.** MGA0251 reportado en farmacopea (19). Especificación: cercana a 1.01

- **METALES PESADOS.** MGA0561 reportado en farmacopea (19). Especificación: no más de 5 ppm.

- **ACIDEZ.**

En el ensayo de acidez, se preparó solución indicadora de fenoftaleína. Se disolvieron 1 g de fenoftaleína en 100 ml de etanol; también se preparó una solución de NaOH al 0.1N con 1 g de NaOH en 250 ml de agua destilada hervida y fría. Se tomaron 5 ml de la muestra y se realizó la titulación. La especificación marca no más de 0.2 ml para su neutralización.(19)

- **RESIDUO NO VOLÁTIL**

En la prueba de residuo no volátil, se colocaron crisoles a peso constante a 350°C en la mufla, posteriormente se colocaron 20 ml de la muestra, evaporandolos a sequedad en baño de vapor, desecando el residuo a 105° durante una hora, para finalmente conocer el peso del residuo. La especificación señala que pesa cuando más 50 mg.(19)

- **LÍMITE DE CONSERVADORES**

Para límite de conservadores se transfirieron 10 ml de peróxido de hidrógeno en un embudo de separación agregando porciones de 5 ml, 2.5 ml y 2.5 ml de una mezcla de 3 volúmenes de cloroformo y 2 volúmenes de éter. Se colocó una cápsula de porcelana a peso constante, en la cual se recogieron los extractos y se evaporaron a temperatura ambiente. El residuo se deseco sobre sílica gel durante 2 hrs. La especificación señala que pesa cuando más 50 mg.(19)

- **VALORACIÓN** En la valoración del peróxido de hidrógeno, se colocaron 20 ml de agua con 2 ml de la muestra en un matraz erlenmeyer, agregando posteriormente 20 ml de ácido sulfúrico diluído, preparando de la misma forma otras dos muestras, las cuales se titularon con una solución de permanganato de potasio 0.1N previamente estandarizada; la cual fue preparada con 3.3 g de permanganato de potasio en agua diluyendo hasta 1000 ml, se colocó en una placa de calentamiento y se dejó hasta ebullición, por un período de 15 min. La solución de permanganato de potasio se valoró pesando aproximadamente 200 mg de oxalato de sodio previamente desecado a 110°C hasta peso constante, disolviendo en 250 ml de agua. Agregando 7 ml de ácido sulfúrico, se calentaron las muestras a 70°C y la solución preparada de permanganato de potasio, se agregó lentamente para realizar su estandarización. Ya valorada la solución de permanganato de potasio, se realizó la

titulación de las muestras de peróxido de hidrógeno. La especificación marca que contiene en cada 100 ml entre 2.5 y 3.5 g de peróxido de hidrógeno.(19)

Los resultados se muestran en la tabla VIII

### **ACIDO ACÉTICO**

- **DENSIDAD.** MGA0251 reportado en la farmacopea (19). La especificación señala 1.045

- **ENSAYO DE IDENTIDAD**

En el ensayo de identidad se realizó la prueba de acetatos descrita en la monografía correspondiente, se preparó la solución reactivo de cloruro férrico. Se pesaron 9 g de cloruro férrico, se disolvieron y se llevaron a 100ml en un matraz aforado; al obtener dicha solución, se colocaron 5 ml de la muestra en un tubo de ensayo y se le adicionaron 1 ml de cloruro férrico observando una coloración roja, confrontandolo con un blanco de reactivos. (19)

- **RESIDUO NO VOLÁTIL**

En la prueba de residuo no volátil, se colocó una cápsula de porcelana a peso constante, agregando 20 ml de ácido acético, se evaporaron en B.V.. Finalmente se pusieron a sequedad durante 1 hr a 105°C. Después de este lapso de tiempo se procedió a pesar la cápsula. La especificación marca no más de 1 mg para 20 ml de muestra.(19)

- **SUSTANCIAS FACILMENTE OXIDABLES**

Se depositaron 5 ml de ácido acético en un matraz erlenmeyer con tapón esmerilado de 125 ml; se agregaron 20 ml de agua y 0.3 ml de solución 0.1 N de permanganato de sodio previamente estandarizada. Realizando por triplicado la prueba. La coloración rosa no cambia a

café rápidamente y el líquido no se colorea totalmente de café, ni pierde el color rosa en menos de 30 seg.(19)

- **ACIDO FÓRMICO E IMPUREZAS OXIDABLES**

5 ml de ácido acético se depositaron en un matraz erlenmeyer de 250 ml junto con 6 ml de ácido sulfúrico y se enfriaron a 20°C aproximadamente. Después se agregaron 2 ml de solución 0.01 M de dicromato de potasio, se dejó reposar 1 min y se agregaron 25 ml de agua destilada y 1 ml de la S.R. de yoduro de potasio recientemente preparada: disolviendo 1.65 g de yoduro de potasio en agua y aforando a 10 ml; posteriormente se realizó la valoración de la muestra con solución 0.1 M de tiosulfato de sodio, previamente estandarizada, utilizando como indicador almidón. Se realizaron tres determinaciones. La especificación señala que se requiere no menos de 1 ml de solución 0.1 M de tiosulfato de sodio.(19)

- **METALES PESADOS.** Según procedimiento MGA 0561 de la farmacopea, la especificación señala no más de 10 ppm.(19)

- **VALORACIÓN**

En un matraz erlenmeyer de 125 ml se pesaron 1050 mg (aprox. 1ml) de ácido acético, se agregaron 6.6 ml de agua y se realizó la valoración de la muestra con solución 1 N de hidróxido de sodio previamente estandarizada; se utilizó como solución indicadora fenoftaleína.(19)

Los resultados se muestran en la tabla IX.

### **COMPATIBILIDAD ENTRE LOS INGREDIENTES PRIMARIOS Y LOS COMPONENTES DEL SANITIZANTE.**

En el caso del peróxido de hidrógeno, debido a sus propiedades fisicoquímicas y por ser un compuesto inorgánico, no fue posible realizar Cromatografía en Capa Fina como se efectúa para formas



farmacéuticas al seguir el comportamiento del activo con los excipientes. Para el peróxido de hidrógeno se realizó el seguimiento con la prueba de densidad y al ser mezclado con el ácido acético se obtenía respuesta en el espectrofotómetro de absorción UV-visible en un rango de 200 a 250 nm, de tal forma que las interacciones entre ambos podían ser detectadas.

- ♦ Se prepararon mezclas de peróxido de hidrógeno y ácido acético en concentraciones bajas a las cuales se les realizaron varias pruebas como se muestra en la TABLA IV.

FORMULACIÓN	CONCENTRACIÓN DE LOS COMPONENTES	PRUEBAS
A	*175 ml de ácido acético (1:1000) *75 ml de peróxido de hidrógeno al 0.03%	*Densidad. *Barrido en el espectrofotómetro de 200 a 250 nm.
B	*70 ml de ácido acético (1:10) *30 ml de peróxido de hidrógeno al 3%	*Densidad. *Barrido en el espectrofotómetro de 200 a 250 nm.
C	*60 ml de ácido acético (1:10). *40 ml de peróxido de hidrógeno al 3%	*Densidad. *Barrido en el espectrofotómetro de 200 a 250 nm.

TABLA IV. FORMULACIONES CON SUS RESPECTIVOS ENSAYOS PARA DETERMINAR SU COMPATIBILIDAD ENTRE ACTIVOS Y COMPONENTES.

Los resultados se muestran en la TABLA X

Se realizó el barrido en el espectrofotómetro de 200 a 250 nm del peróxido de hidrógeno y ácido acético por separado.

- ♦ Se realizaron pruebas de compatibilidad de la formulación J con diferentes colorantes y/o indicadores se muestran en la TABLA V. A 10 ml de la mezcla se le adicionaron cantidades pequeñas de

colorante; de tal forma que satisficiera el obtener un color agradable a la vista.

<b>FORMULACIÓN J</b>	<b>COLORANTES</b>
6.6% de peróxido de hidrógeno	Amarillo N°6
1% de ácido acético	Rojo N° 6
	Amarillo N° 5 Amyc laca
	Sunset Yellow
	<b>INDICADORES ÁCIDO-BASE</b>
	Verde de bromocresol (amarillo-azul)
	Violeta de metilo (amarillo-azul)
	<b>INDICADORES ÓXIDO-REDUCCIÓN</b>
	Azul de metilo (azul-incoloro)

TABLA V. CONCENTRACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA FORMULACIÓN I Y EL LISTADO DE LOS COLORANTES E INDICADORES UTILIZADOS EN LA PRUEBA.

Los resultados se muestran en la tabla XI.

- Para elegir un aroma, se probaron para ello diez combinaciones, las cuales se muestran en la tabla VI, junto a la composición de la formulación I con la que se realizó el ensayo, ajustando el aroma con la adición a gotas hasta obtener un olor agradable.

<b>FORMULACIÓN J</b>	<b>COMBINACIONES</b>
6.6% de peróxido de hidrógeno	Piña
1% de ácido acético	Limón
	Durazno
	Durazno-Manzana
	Lima-Limón-Piña
	Lima-Limón
	Menta
	Piña-Durazno
	Manzana
	Lima

TABLA VI. FORMULACIÓN J Y LAS COMBINACIONES PROBADAS DE LOS DIFERENTES AROMAS

Los resultados de esta prueba se muestran en la tabla XII.

## 6.5.2. ESTUDIOS DE FORMULACIÓN:

### SELECCIÓN DEL PORCENTAJE ÓPTIMO DE LOS ACTIVOS Y COMPONENTES DEL SANITIZANTE.

- Esta selección se realizó tomando en cuenta, las pruebas de compatibilidad entre el ácido acético, el peróxido de hidrógeno y el azul de metilo, además de las pruebas de eficacia y estabilidad.

### ESTUDIOS DE EFICACIA.

#### COEFICIENTE FENÓLICO

- Se evaluó la eficacia de las formulaciones por medio del método del coeficiente fenólico (8) el cual se realizó de la siguiente forma: primeramente se realizó una siembra de cada microorganismo 36 hrs antes de la prueba, las cepas empleadas fueron, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, y *Pseudomona aureuginosa*, sembradas en agar soya tripticaseína en tubo. Al momento de realizar la prueba los microorganismos se transfieren en tubos con caldo lactosado haciendo una suspensión de cada cepa. Se realizó una dilución de la mezcla sanitizante al 1%, de esta dilución se prepararon otras diluciones:  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ , y  $10^5$ , para cada una de las cepas. En el caso del fenol se realiza una solución al 5%, preparando de esta, las siguientes diluciones:

*Salmonella typhimurium* 1:90 y 1: 100

*Staphylococcus aureus* 1:60 y 1: 70

*Pseudomona aeruginosa* 1:80 y 1: 90

- Para cada dilución y por cada microorganismo se prepararon tres tubos de ensayo con tapa rosca con 10 ml de caldo soya tripticaseína estéril. Se toman 5 ml de una de las diluciones del sanitizante, se colocan en un tubo de ensayo estéril y se agregan 0.5 ml de la suspensión del microorganismos, dejando interactuar ambos en

períodos de 5, 10 y 15 min, tomando a cada tiempo una muestra de 0.05 ml; la cual se depositó en un tubo de ensaye con caldo soya tripticaseína. Este mismo procedimiento se realizó para cada una de las diluciones y para cada uno de los microorganismos. En el caso del fenol, se hizo exactamente lo mismo se tomaron 5 ml del fenol, se colocaron 0.5 ml del microorganismo y se dejó interactuar a los 5, 10 y 15 ml, tomando muestras a cada tiempo de 0.05 ml, transfiriendolos a un tubo con caldo soya tripticaseína estéril; por microorganismo y por dilución del fenol. Los testigos positivos se realizaron tomando 0.05 ml de la suspensión del microorganismo y se transfieren a un tubo con caldo soya tripticaseína estéril, realizando un testigo positivo por microorganismo. Para los testigos negativos se tomaron 0.05 ml del sanitizante, transfiriendolos a un tubo con caldo soya tripticaseína estéril, se realizó un testigo negativo por cada dilución del sanitizante y por cada dilución del fenol. Al terminar la prueba se incubaron las muestras y los testigos positivos y negativos, a 37°C, obteniéndose resultados a las 36 hrs. Las muestras se tomaron con jeringas estériles.

#### **PRUEBA DE EFICACIA**

- El otro método utilizado fue una simple prueba de eficacia, diferente al método del coeficiente fenólico, en la cuál no se realizaron diluciones de la mezcla sanitizante. Se preparó agar soya tripticaseína estéril, suficiente para el número de cajas petri estériles a utilizar. Las cepas ( en las tablas de resultados se especifican los diferentes microorganismos utilizados en la prueba para cada formulación) se sembraron 36 hrs antes de realizar la prueba en agar soya tripticaseína en el caso de las bacterias, para los hongos en agar papa dextrosa por la técnica de agar en tubo inclinado. De las cepas se realizaron las correspondientes suspensiones en tubo de ensaye con 10ml de caldo lactosado. Para transferir las muestras del hongo, se prepararon tubos de ensaye tapa rosca con caldo lactosado. Se tomaron 5 ml del sanitizante, se transfieren a un tubo estéril, donde posteriormente se transfieren 0.5 ml de la suspensión del microorganismo, se toman muestras de 0.05ml a los 5, 10, y 15 min

de exposición, depositando cada muestra en una caja petri estéril vertiendo enseguida agar soya tripticaseína estéril a 45°C. En el caso del hongo las muestras se transfirieron en tubos con caldo lactosado. Los testigos positivos se realizaron de la misma forma, para las bacterias en caja petri vertiendo agar soya tripticaseína, para los hongos el testigo positivo se realizo en caldo lactosado. Para el testigo negativo; se realizó uno en caja petri y otro en tubo con caldo lactosado. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 36 hrs. La prueba se realizó por duplicado para obtener mejores resultados.

FORMULACIÓN	COMPOSICIÓN	PRUEBA
D	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 70 % de ácido acético (1:10).</li> <li>* 30 % de peróxido de hidrógeno al 30 %.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coeficiente fenólico, resultados en la tabla XIII</li> <li>- Prueba de eficacia, resultados en la tabla XIV</li> </ul>
E	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 70 % de ácido acético (1:100).</li> <li>* 30 % de peróxido de hidrógeno al 30%</li> </ul>	- Coeficiente fenólico, resultados en la tabla XIII
F	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 0.2 % de peróxido de hidrógeno.</li> <li>* 0.1 % de ácido acético.</li> </ul>	- Coeficiente fenólico, resultados en la tabla XV
G	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 4% de peróxido de hidrógeno.</li> <li>* 2% de ácido acético.</li> </ul>	- Coeficiente fenólico, resultados en la tabla XV
H	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 66.66 % de peróxido de hidrógeno.</li> <li>* 10 % de ácido acético.</li> </ul>	- Prueba de eficacia, resultados en la tabla XXI, XXIV, XXV
III	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 66.66 % de peróxido de hidrógeno.</li> <li>* 10 % de ácido acético.</li> <li>* 3 % de azul de metilo</li> </ul>	- Prueba de eficacia, resultados en la tabla XXV
J	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 6.6 % de peróxido de hidrógeno.</li> <li>* 1 % de ácido acético.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coeficiente fenólico, resultados en la tabla XX, XXI</li> <li>- Prueba de eficacia, resultados en la tabla XVI, XVII, XXIII</li> </ul>
II	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 2.2% de peróxido de hidrogeno.</li> <li>* 0.3% de ácido acético</li> </ul>	- Prueba de eficacia, resultados en la tabla XVIII
J2	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 1.32 % de peróxido de hidrógeno.</li> <li>* 0.2 % de ácido acético</li> </ul>	- Prueba de eficacia, resultados en la tabla XIX
K	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 0.66 % de peróxido de hidrógeno.</li> <li>* 0.1 % de ácido acético.</li> </ul>	- Coeficiente fenólico, resultados en la tabla XX
M	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 6.6 % de peróxido de hidrógeno.</li> <li>* 1% de ácido acético</li> <li>* 0.3% de azul de metilo</li> </ul>	- Prueba de eficacia, los resultados se muestran en la tabla XXVI

TABLA VII. DIFERENTES FORMULACIONES, SU COMPOSICIÓN Y LOS ESTUDIOS DE EFICACIA REALIZADOS PARA CADA UNA.

## **PRUEBAS PRELIMINARES.**

### **Estudio a través del tiempo.**

- Se realizó una prueba a las formulaciones B,C,D y E en frascos de vidrio color ambar abiertos y cerrados, a temperatura ambiente; colocando 100 ml de cada mezcla en un frasco abierto y en otro cerrado; con el fin de observar cambios en el transcurso del tiempo, realizando el ensayo de densidad y un barrido en el espectrofotómetro de 190 a 250 nm. La prueba se realizó durante tres días. Los resultados se muestran en la tablas XXVII y XXVIII.

#### **FORMULACIÓN B**

- 70% de ácido acético (1:10)
- 30 % de peróxido de hidrógeno al 3%

#### **FORMULACIÓN C**

- 60 % de ácido acético (1:10)
- 40 % de peróxido de hidrógeno al 3%

#### **FORMULACIÓN D**

- 70 % de ácido acético (1:10).
- 30 % de peróxido de hidrógeno al 30%

#### **FORMULACIÓN E**

- 70 % de ácido acético (1:100)
- 30 % de peróxido de hidrógeno al 30%

## **ESTUDIOS DE CICLAJE**

- A las formulaciones J y M se les realizó una prueba de ciclaje durante diez días colocando la mezcla en un frasco de vidrio color ambar y un frasco de vidrio transparente por cada temperatura, 4°C, 37°C y 50°C, observando los cambios de apariencia. Los primeros cinco días, las mezclas sanitizantes se colocaron de la siguiente forma dentro de las estufas: dos muestras a 4°C, dos muestras a 37°C y dos a 50°C. Los siguientes últimos cinco días las mezclas se cambiaron de temperatura: las que se encontraban en 50°C se trasladaron a 4°C. Los resultados se muestran en la tabla XXIX.

## DETECCIÓN DE RESIDUOS

- Tomando en cuenta las propiedades del ácido acético y de los métodos de análisis, disponibles en la monografía correspondiente (19), se decidió implementar el ensayo de identidad del ácido acético para detectar residuos del mismo. Se hicieron diluciones de ácido acético 1:10000, 1:1000, 1: 500, 1:250, 1:100 . 1:10. y 1:1. En tubos de ensayo se colocaron 1 ml de cada dilución, agregando 5 ml de una solución reactivo de cloruro férrico, realizando también un blanco. Se observó el cambio de color y tonalidad a rojo de cada una de las diluciones, hasta percibir una disminución o pérdida de color. De tal forma que se evaluara hasta que dilución era posible detectar la presencia de ácido acético. Los resultados se muestran en la tabla XXX.
- Se realizó un método de cuantificación del ácido acético por medio de HPLC (22); se tomó un hisopo el cual se froto en una superficie (vidrio, madera, pintura, piel, concreto y tela) previamente sanitizada con la formulación final, posteriormente se colocó en un tubo de ensayo con un 1 ml de agua durante 10 min. Finalmente la muestra se inyectó en el cromatógrafo. Corriendo un estándar de ácido acético para comparar resultados.

### Condiciones:

- a) Sistema de elución: A: Agua / Acetonitrilo 40/60 v/v 3 ml
- b) Gradiente: 100% A en 10 min
- c) Flujo: 1.5 ml / min
- d) Inyección: 20  $\mu$ l
- e) Detector: Electroquímico.
- f) Columna: L.14. Gel de sílice. (Nova-Pak)

Los resultados se muestran en la tabla XXXII

## CONTROLES A LA FORMULACIÓN FINAL

### FORMULACIÓN M (DEFINITIVA)

\* 6.6 % de peróxido de hidrógeno

\* 1% de ácido acético

\* 0.3 % de azul de metilo

- A la formulación M se le realizaron diferentes ensayos, entre ellos la prueba de acidez (19); en donde se agregaron a 1 ml de muestra (sanitizante) 2.5 ml de fenofaleína, realizando una titulación utilizando para ello Na OH al 0.1N previamente estandarizado. Realizando la prueba por duplicado.
- Se evaluó el pH, la densidad (19) (ensayo ya descrito con anterioridad) y finalmente se realizó un barrido del sanitizante en un rango de 190 a 250 nm.

Los resultados se muestran en la tabla xxxi.

### DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL SANITIZANTE EN DIFERENTES SUPERFICIES.

- Las diferentes formulaciones se sometieron a la prueba de toxicidad en diferentes tipos de superficie; piel, pintura, madera, acero inoxidable, concreto y vidrio. Se agregó una pequeña cantidad del sanitizante en un trozo de tela, el cual se frotó en una de las superficies, la cual se delimitó con cinta adhesiva, para observar los cambios existentes en la superficie, ya sea que sean degenerativos o no. Los resultados se muestran en la tabla xxxii.



## 7. RESULTADOS

CARACTERIZACION DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO		
PRUEBA	LIMITE	RESULTADOS
<b>Descripción</b>	Líquido incoloro, inodoro o con olor parecido al ozono, ácido al papel tornasol.	+
<b>Ensayos de identidad</b>	La capa acuosa toma coloración fugaz, la capa etérea se colorea, después de haberse dejado reposar.	+
<b>Densidad</b>	Aprox. 1.01	$\mu = 1.0656$
<b>Acidez</b>	Cuando más 2.5 ml para neutralizar 25 ml de muestra	1) 5ml = 0.2ml 2) 5ml = 0.2 ml
<b>Residuo no volátil</b>	Pesa cuando más 50 mg	+
<b>Bario</b>	No se produce turbidez y precipitado dentro de un lapso de 10 min.	+
<b>Límite de conservadores</b>	Pesa cuando más 50 mg	0.5 mg, 0.5 mg
<b>Valoración</b>	Contiene en cada 100 ml entre 2.5 y 3.5 g de peróxido de hidrógeno.	$\mu = 3.59\text{g}/100\text{ ml}$
<b>Metales pesados</b>	No más de 5 ppm	+

$\mu$  = Valor Promedio de tres determinaciones.

TABLA VIII. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

<b>CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO ACÉTICO</b>		
<b>PRUEBA</b>	<b>LIMITE</b>	<b>RESULTADO</b>
<b>Descripción</b>	<b>Líquido inoloro; claro, de olor ácido, fuerte y característico.</b>	<b>+</b>
<b>Acido fórmico e impurezas oxidables</b>	<b>No menos de 1 ml de solución 0.1 M de tiosulfato de sodio</b>	<b><math>\mu = 1.36</math> ml</b>
<b>Ensayo de identidad</b>	<b>A. Color rojo cuando se neutraliza</b>	<b>+</b>
<b>Residuo no volátil</b>	<b>No más de 1 mg para 20 ml de muestra</b>	<b><math>\mu = 0.65</math></b>
<b>Sustancias fácilmente oxidables</b>	<b>La coloración rosa no cambia a café rápidamente y el líquido no se colorea totalmente de café, ni pierde el color rosa en menos de 30 seg.</b>	<b>+</b>
<b>Densidad</b>	<b>1.045</b>	<b>1.0469</b>
<b>Valoración</b>	<b>Cada ml de solución 0.1 N de hidróxido de sodio equivale a 60.05 mg</b>	<b><math>\mu = 60.37</math> mg</b>
<b>Metales Pesados</b>	<b>No más de 10 ppm</b>	<b>+</b>

$\mu$  = Valor Promedio de tres determinaciones.

TABLA IX. RESULTADOS DE CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO ACÉTICO

**COMPATIBILIDAD ENTRE LOS INGREDIENTES  
PRIMARIOS (PEROXIDO DE HIDROGENO Y ACIDO  
ACETICO)**

<b>FORMULACION</b>	<b>DENSIDAD</b>
A	1.0005
	0.9966
B	1.0154
	1.0151
C	1.0124
	1.0118

TABLA X. RESULTADOS DE DENSIDAD DE TRES FORMULACIONES TENTATIVAS.

**COMPATIBILIDAD DEL COLOR CON LA MEZCLA  
SANITIZANTE**

<b>COLOR Y/O INDICADOR</b>	<b>TIEMPO DE PERMANENCIA (DIAS)</b>										
--------------------------------	-------------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>AMARILLO Nº6</b>	-	-	-	-	-/+	-/+	+	+	+	+	+
<b>ROJO Nº6</b>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>COLOR SUNSET YELLOW</b>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>VERDE DE BROMOCRESOL</b>	-	-/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>AZUL DE METILO</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>AMARILLO Nº 5</b>	-	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	+

(-) PERMANECE EL COLOR (+/-),(-/+), DESAPARECE GRADUALMENTE EL COLOR, (+) DESPARECE COMPLETAMENTE EL COLOR.

TABLA XI. DIFERENTES COLORANTES E INDICADORES SOMETIDOS A UNA PRUEBA DE PERMANENCIA DE COLOR, EN LA FORMULACIÓN J.

## COMPATIBILIDAD DEL AROMA CON LA MEZCLA SANITIZANTE

AROMA	TIEMPO DE PERMANENCIA (DÍAS)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PIÑA	-	-	-	-	-/+	-/+	+	+	+	+	+
LIMON	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
DURAZNO	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MANZANA	-	-/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MENTA	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LIMA	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
LIMA-LIMON	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PIÑA- DURAZNO	-	-	-	-	-/+	-/+	-/+	-/+	+	+	+
DURAZNO- MANZANA	-	-	-	-	-/+	-/+	-/+	-/+	+	+	+
LIMA-LIMÓN- PIÑA	-	-/+	-/+	-/+	-/+	+	+	+	+	+	+

(+) OLOR PICANTE SIN PERCEPCIÓN DEL AROMA  
 (-/+) COMIENZA A PRESENTARSE UN AROMA IRRITANTE  
 (-) SE PERCIBE EL AROMA AGRADABLE.

TABLA XII. RESULTADOS DE COMPATIBILIDAD DE AROMA CON LA FORMULACIÓN J.

## PRUEBA DE EFICACIA

### COEFICIENTE FENÓLICO

#### MICROORGANISMOS

*Salmonella typhimurium*

*Staphylococcus aureus*

*Pseudomonas aeruginosa*

FORMULACIÓN. D: 70 % de ácido acético (1:10) y 30% de peróxido de hidrógeno al 30 %  
E: 70 % de ácido acético (1:100) y 30 % de peróxido de hidrógeno al 30%.

DIL.	TIEMPO DE EXPOSICIÓN (MIN)
------	----------------------------

	5	10	15
$10^1$	+	+	+
$10^2$	+	+	+
$10^3$	+	+	+
$10^4$	+	+	+
$10^5$	+	+	+

(-) NO EXISTE CRECIMIENTO

(+) EXISTE CRECIMIENTO

TABLA XIII. RESULTADOS DE EFICACIA DE DOS MEZCLAS SANITIZANTES POR MEDIO DEL MÉTODO DEL COEFICIENTE FENÓLICO.

## PRUEBA DE EFICACIA

**MICROORGANISMOS:**

*Aspergillus niger*  
*Escherichia coli*

**FORMULACIÓN: D:** 70 % de ácido acético (1:10) y 30 % de peróxido de hidrógeno al 30 %.

TIEMPO DE EXPOSICIÓN (MIN)	MICROORGANISMOS			
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
	R1	R2	R1	R2
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-

(-) NO EXISTE CRECIMIENTO  
R1 = REPETICIÓN 1  
R2 = REPETICIÓN 2

(+) EXISTE CRECIMIENTO

TABLA XIV. RESULTADOS DE EFICACIA DE LA FORMULACIÓN D.

## PRUEBA DE EFICACIA

### COEFICIENTE FENÓLICO

**MICROORGANISMOS**

*Salmonella typhimurium*

*Staphylococcus aureus*

*Pseudomona aeruginosa*

**FORMULACIÓN:** F: 0.2 % de peróxido de hidrógeno y 0.1 % de ácido acético

G: 4% de peróxido de hidrógeno y 2 % de ácido acético.

DEL	PERÍODO DE EXPOSICIÓN (HORAS)
-----	-------------------------------

	F	G	H
10'	+	+	+
15'	+	+	+
20'	+	+	+
30'	+	+	+
45'	+	+	+

(-) NO EXISTE CRECIMIENTO

(+) EXISTE CRECIMIENTO

TABLA XV. EFICACIA DE LAS FORMULACIONES F Y G POR MEDIO DEL MÉTODO DEL COEFICIENTE FENÓLICO.



## PRUEBA DE EFICACIA

FORMULACIÓN J: 2D: 6.6% de peróxido de hidrógeno y 1% de ácido acético

SANITIZANTE COMERCIAL: SANITAIZER (ACTIVO: cloruro de benzalconio)



	S1	S2	S1	S2
5	-	-	-	-
10	-	-	-	-
15	-	-	-	-

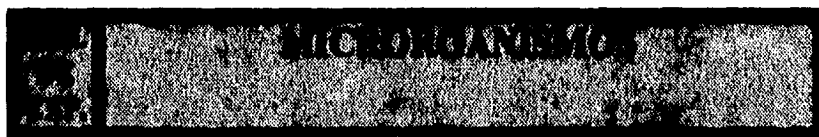
(-) NO EXISTE CRECIMIENTO

(+) EXISTE CRECIMIENTO

TABLA XVI. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EFICACIA ENTRE UN SANITIZANTE COMERCIAL (S2) Y LA FORMULACIÓN J (S1).

## PRUEBA DE EFICACIA

*SANITIZANTE: 2D: 6.6% de peróxido de hidrógeno y 1% de ácido acético*



	RI	RI	RI	RI	RI	RI	RI
1	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-

(-) NO EXISTE CRECIMIENTO

(+) EXISTE CRECIMIENTO

TABLA XVII. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EFICACIA DE LA FORMULACIÓN J, REALIZANDO REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.

## PRUEBA DE EFICACIA

FORMULACIÓN: J1 2.2 % de peróxido de hidrógeno y 0.3 % de ácido acético.

TIEMPO DE EXPOSICIÓN (min)	MICROORGANISMOS	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
5	-	-
10	-	-
15	-	-

(-) NO EXISTE CRECIMIENTO

(+) EXISTE CRECIMIENTO

TABLA XVIII. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EFICACIA DE LA FORMULACIÓN J1.

## PRUEBA DE EFICACIA

*FORMULACIÓN J2: 1.32 % de peróxido de hidrógeno y 0.2 % de ácido acético.*

	MICROORGANISMOS	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<b>5</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>10</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>15</b>	<b>-</b>	<b>+</b>

(-) NO EXISTE CRECIMIENTO

(+) EXISTE CRECIMIENTO

TABLA XIX. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EFICACIA DE LA FORMULACIÓN J2..

## PRUEBA DE EFICACIA

### COEFICIENTE FENÓLICO

**MICROORGANISMOS**  
*Salmonella typhimurium*  
*Staphylococcus aureus*  
*Pseudomonas aeruginosa*

**FORMULACIÓN:** J: 6.6% de peróxido de hidrógeno y 1 % de ácido acético.  
K: 0.66 % de peróxido de hidrógeno y 0.1% de ácido acético.

#### DIL.      MIENTO DE EFICACIA (%)

	5	10	15
$10^1$	+	+	+
$10^2$	+	+	+
$10^3$	+	+	+
$10^4$	+	+	+
$10^5$	+	+	+

(-) NO EXISTE CRECIMIENTO

(+) EXISTE CRECIMIENTO

TABLA XX. RESULTADOS DE EFICACIA DE DOS FORMULACIONES POR EL MÉTODO DEL COEFICIENTE FENÓLICO.

## PRUEBA DE EFICACIA

### COEFICIENTE FENÓLICO

MICROORGANISMO:

*Bacillus subtilis*

FORMULACIÓN : J: 6.6% de peróxido de hidrógeno y 1 % de ácido acético.

	TIEMPO DE EXPOSICIÓN (min.)		
DIL	5	10	15
$10^1$	+	+	+
$10^2$	+	+	+
$10^3$	+	+	+

(-) NO EXISTE CRECIMIENTO

(+) EXISTE CRECIMIENTO

TABLA XXI. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EFICACIA DE TRES DILUCIONES DE UNA FORMULACIÓN, POR EL MÉTODO DEL COEFICIENTE FENÓLICO.

## PRUEBA DE EFICACIA

**MICROORGANISMO:**

*Bacillus subtilis*

**FORMULACIÓN: H:** 66.66% de peróxido de hidrógeno y 10 % de ácido acético.

TIEMPO DE EXPOSICIÓN (min.)			
DIL	5	10	15
1:3	-	-	-
1:5	-	-	-

(-) NO EXISTE CRECIMIENTO

(+) EXISTE CRECIMIENTO

TABLA XXII. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EFICACIA DE DOS DILUCIONES DE LA FORMULACIÓN H.

## PRUEBA DE EFICACIA

**MICROORGANISMO:**

*Bacillus subtilis*  
*Escherichia coli*  
*Salmonella typhimurium*

**FORMULACIÓN: J:** 6.66% de peróxido de hidrógeno y 1 % de ácido acético.

<b>TIEMPO DE EXPOSICIÓN (min.)</b>			
<b>DIL</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>
<b>1:3</b>	-	-	-
<b>1:5</b>	+	-	-

(-) NO EXISTE CRECIMIENTO

(+) EXISTE CRECIMIENTO

**TABLA XXIII. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EFICACIA DE DOS DILUCIONES DE LA FORMULACIÓN J..**



## PRUEBA DE EFICACIA

*MICROORGANISMOS*  
*Salmonella typhimurium*  
*Staphylococcus aureus*  
*Pseudomona aeruginosa*

FORMULACIÓN H: 66.66% de peróxido de hidrógeno y 10 % de ácido acético.



DIL	5	10	15
1:10	-	-	-
1:30	-	-	-

(-) NO EXISTE CRECIMIENTO

(+) EXISTE CRECIMIENTO

TABLA XXIV. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EFICACIA DE DOS DILUCIONES DE LA FORMULACIÓN H.

## PRUEBA DE EFICACIA

**MICROORGANISMOS**  
*Salmonella typhimurium*  
*Staphylococcus aureus*  
*Pseudomona aeruginosa*

**FORMULACIÓN: H:** 66.66% de peróxido de hidrógeno y 10 % de ácido acético.  
**HI:** 3 % de azul de metilo, 66.66% de peróxido de hidrogeno y 10 % de ácido acético.

	<b>TIEMPO DE EXPOSICIÓN (min.)</b>		
<b>DIL</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>
<b>1:10</b>	-	-	-
<b>1:10*</b>	-	-	-

(-) NO EXISTE CRECIMIENTO

(+) EXISTE CRECIMIENTO

TABLA XXV. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EFICACIA DE DOS DILUCIONES (1:10  
\* CON AZUL DE METILO Y 1:10 SIN AZUL DE METILO).

## PRUEBA DE EFICACIA

**MICROORGANISMOS:**  
*Salmonella typhimurium*  
*Staphylococcus aureus*  
*Pseudomona aeruginosa*

**FORMULACIÓN M:** 6.6 % DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO, 1 % DE ÁCIDO ACÉTICO Y 0.3 % DE AZUL DE METILO.

MICROORGANISMO			
TIEM. DE EXP. (min)	SALMONELLA TYPHIMURIUM	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	PSEUDOMONA AERUGINOSA
5	-	-	-
10	-	-	-
15	-	-	-

(-) NO EXISTE CRECIMIENTO

(+) EXISTE CRECIMIENTO

TABLA XXVI. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EFICACIA DE LA FORMULACIÓN M (DEFINITIVA).

## ESTUDIO A TRAVÉZ DEL TIEMPO

<b>0</b>	<b>Ba</b>	<b>1.0132</b>
	<b>Bc</b>	<b>1.0136</b>
	<b>Ca</b>	<b>1.0071</b>
	<b>Cc</b>	<b>1.0071</b>
<b>1</b>	<b>Ba</b>	<b>1.0134</b>
	<b>Bc</b>	<b>1.0116</b>
	<b>Ca</b>	<b>1.0068</b>
	<b>Cc</b>	<b>1.0073</b>
<b>2</b>	<b>Ba</b>	<b>1.0135</b>
	<b>Bc</b>	<b>1.0140</b>
	<b>Ca</b>	<b>1.0070</b>
	<b>Cc</b>	<b>1.0071</b>

**TABLA XXVII. RESULTADOS DE DENSIDAD AL SOMETER DOS FORMULACIONES A UN ESTUDIO A TRAVÉZ DEL TIEMPO EN FRASCOS DE VIDRIO COLOR AMBAR (a) ABIERTOS Y (c) CERRADOS, A TEMPERATURA AMBIENTE.**

**ESTUDIO A TRAVÉZ DEL TIEMPO**

<b>TIEMPO (DÍA)</b>	<b>FORMULACIÓN</b>	<b>DENSIDAD (g/ml)</b>
0	D	1.0048
	E	1.0050
1	<i>Da</i>	1.0048
	<i>Dc</i>	1.0048
	<i>Ea</i>	1.0039
	<i>Ec</i>	1.0052
2	<i>Da</i>	1.0061
	<i>Dc</i>	1.0043
	<i>Ea</i>	1.0059
	<i>Ec</i>	1.0047

TABLA XXVIII. RESULTADOS DE DENSIDAD AL SOMETER DOS FORMULACIONES A UN ESTUDIO A TRAVÉZ DEL TIEMPO EN FRASCOS (a) ABIERTOS Y (c) CERRADOS, A TEMPERATURA AMBIENTE.

## ESTUDIO DE CICLAJE DEL SANITIZANTE

Se evaluó solo la apariencia.

DIAS	TEMPERATURA (°C)		
	4	37	50
5	A	B	C
10	C	B	A*

\* PRESENCIA DE UN PRECIPITADO.

TABLA XXIX. RESULTADOS DE APARIENCIA DEL ESTUDIO DE CICLAJE REALIZADO AL SANITIZANTE ( 6.6% DE PEROXIDO DE HIDROGENO, 1% DE ACIDO ACETICO Y 0.3% DE AZUL DE METILO.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

### DETECCIÓN DE RESIDUOS

DILUCIÓN	CAMBIO DE COLOR
1:10000	-
1:1000	+/-
1:500	+/-
1:250	+
1:100	+
1:10	+
1:1	+

(+) COLOR ROJO, (+/-) ENTRE ROJO Y NARANJA, (-) SIN CAMBIO

TABLA XXX. RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DEL ÁCIDO ACÉTICO EN DIFERENTES DILUCIONES.

**CONTROLES FINALES A LA FORMULACIÓN FINAL DEL  
SANITIZANTE**

<b>PRUEBA</b>	<b>LIMITES (RESULTADOS)</b>
<b>APARIENCIA</b>	Líquido translucido, color azul
<b>pH</b>	3
<b>ACIDEZ</b>	Cuando más para 1 ml de muestra 19.8 y 20 ml de NaOH al 0.1N
<b>Densidad</b>	1) 0.9973 g/ml 2) 0.9974 g/ml

TABLA XXXI. RESULTADOS DE LOS CONTROLES REALIZADOS A LA FORMULACIÓN DEL SANITIZANTE.



**PRUEBA CON DIFERENTES TIPOS DE SUPERFICIES  
Y LA EVALUACIÓN DE RESIDUOS DEL ACIDO ACÉTICO POR  
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (C.L.A.R)**

FORMULA	SUPERFICIE					
	PIEL	PINTURA	MADERA	CONCRETO	VIDRIO	TELA
<b>H</b>	-	-	-	-	-	-
<b>J</b>	-	-	-	-	-	-
<b>M</b>	-	-	-	-	-	-

**H:** 66.66% de peróxido de hidrógeno, 10% de ácido acético.

**J:** 6.6% de peróxido de hidrógeno, 1% de ácido acético.

**M:** 6.6% de peróxido de hidrógeno, 1% de ácido acético y 0.3% de azul de metilo.

(-) NO EXISTE DETERIORO DE LA SUPERFICIE Y NO EXISTEN RESIDUOS DE ÁCIDO ACÉTICO

(+) PRESENTA DETERIORO DE LA SUPERFICIE Y PRESENCIA DE ÁCIDO ACÉTICO

TABLA XXXII. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE DEGRADACIÓN DE DIFERENTES TIPOS DE SUPERFICIES Y PRESENCIA DE ACIDO ACÉTICO CON FORMULACIONES TENTATIVAS.

**PRUEBA DE EFICACIA**

<b>ML. DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN 100 ml DE SOLUCIÓN</b>	<b>TIEMPO DE EXPOSICIÓN (MIN)</b>
---	---------------------------------------

	5	10	15
66	-	-	-
22	-	-	-
13.2	-	-	-
6.6	-	-	-
2.2	-	-	-
1.32	+	-	-
0.66	+	+	+
0.066	+	+	+
0.00666	+	+	+
0.00066	+	+	+
0.00006	+	+	+

TABLA XXXIII. DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN SOLUCIÓN CON SUS RESPECTIVOS RESULTADOS DE EFICACIA.

**ESTUDIOS DE EFICACIA**

	H	H1	H2	J	J1	J2	P	Q	R	S	T
5	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10
10	0	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10
15	0	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
X <sub>j</sub>	0	0	0	0	0	10	30	30	30	30	30
X̄	0	0	0	0	0	3.3	10	10	10	10	10

n = Tamaño de muestra X<sub>j</sub> = Sumas X̄<sub>j</sub> = Medias N = 33 X̄ = 160 X̄ = 4.84  
 TABLA XXXIV. CALCULOS ESTADISTICOS: 0 = (-) NO EXISTE CRECIMIENTO, 10 = (+) EXISTE CRECIMIENTO

H<sup>0</sup>:  $\mu_1 = \mu_2$  : No existe efecto de la concentración en la eficacia del sanitizante.

H<sup>a</sup> :  $\mu_1 \neq \mu_2$ : Existe efecto de la concentración en la eficacia del sanitizante.

**TABLA DE ANADEVA**

FUENTE DE VARIACIÓN	G.L	S.C.	C.M	F <sub>CALC.</sub>	F <sub>TEÓRICA</sub>
Trat.	11-1=10	757.5758	75.7575	75.75/3.03 = 25	F <sub>0.95,10,22</sub> = 2.30
Error	33 - 11 = 22	66.66	3.03		
TOTAL	33 - 1 = 32	824.24	-		

TABLA XXXV. RESULTADOS ESTADISTICOS  
 F<sub>CALCULADA</sub>, es mayor que F<sub>TEÓRICA</sub> por lo que se rechaza H<sup>0</sup> y se acepta H<sup>a</sup>; la concentración del sanitizante afecta la eficacia del mismo a través del tiempo.

## **8. ANALISIS DE RESULTADOS**

### **COMPATIBILIDAD ENTRE LOS INGREDIENTES PRIMARIOS Y LOS COMPONENTES DEL SANITIZANTE.**

- De acuerdo a la tabla X, se muestran los resultados de densidad de tres diferentes mezclas (de peróxido de hidrógeno y ácido acético), lo que demuestra la afinidad química entre los componentes en solución, esto se percibe en la ligera variación de los resultados. En el caso de los espectros de absorción U.V.- visible no existieron cambios en el desplazamiento de la curva. Físicamente, no se presentaron reacciones violentas, ni exotérmicas y no se presentaron cambios visuales.
- En el caso de los resultados obtenidos en la tabla XI el indicador azul de metilo no presentó cambios en la coloración, sin embargo los otros indicadores y colorantes fueron desapareciendo conforme transcurría el tiempo; lo cual indica la oxidación de los mismos producida por los componentes primarios del sanitizante. Por ello se selecciono el azul de metilo como colorante del sanitizante debido a que no se vio afectado por la acción oxidante de los componentes.
- En la tabla XII, se muestran los resultados de la compatibilidad de diferentes aromas con el sanitizante, percibiendo la poca estabilidad de estos con los componentes del sanitizante, ocasionada por su acción oxidante. Como la formulación propuesta no despide olores picantes, ni molestos, se decidió no continuar con la búsqueda de un aroma.

## **SELECCIÓN DEL PORCENTAJE OPTIMO DE LOS ACTIVOS Y COMPONENTES DEL SANITIZANTE.**

- Tomando en cuenta los resultados de compatibilidad, tabla X, XI, y XII, que muestran al peróxido de hidrógeno, el ácido acético y el azul de metileno como componentes del sanitizante debido a sus características químicas y físicas, y a los resultados de eficacia, tablas XXIII, XXVI y XXXIII donde se observa que la mezcla con el porcentaje de 6.6 % de peróxido de hidrógeno, 1.0 % de ácido acético y 0.3 % de azul de metilo es eficaz como agente bactericida la cual puede diluirse a 1:3 y 1:5 como se muestra en la tabla XXIII obteniendo la misma eficacia en corto tiempo.

### **ESTUDIOS DE EFICACIA**

- De acuerdo a la tabla XXXIII, se observan variaciones de la eficacia del sanitizante conforme disminuye la concentración (lo que se confirma en la tabla XXXIV) de los componentes, sin embargo ilustra también la concentración en la que el sanitizante es un eficaz bactericida la cual es la que corresponde al 6.6 % de peróxido de hidrógeno. En la tabla XXV, se observa que las formulaciones H y H1 son eficaces en diluciones 1:10 ( 6.6 % de peróxido de hidrógeno, 1.0 % de ácido acético y 0.3% de azul de metilo).

### **ESTUDIO A TRAVÉS DEL TIEMPO**

- Como se observa en las tablas XXVII y XXVIII, en las formulaciones B,C,D y E no se presenta variación en los resultados de densidad en el transcurso del tiempo, tampoco se ve efecto por encontrarse en recipientes de vidrio, color ambar abiertos y cerrados; lo que indica estabilidad entre los componentes de la mezcla sanitizante.

## **ESTUDIOS DE CICLAJE**

- En el caso de las formulaciones J y M; tabla XXIX, no se percibe ningún cambio drástico en la apariencia de las formulaciones a los cambios de temperatura, solo se presento una ligera precipitación al elevar la temperatura.

## **DETECCIÓN DE RESIDUOS**

- De acuerdo a la tabla XXX, se observa que el ensayo de identidad del ácido acético basado en una reacción colorimétrica de éste con el cloruro férrico, no proporciona una respuesta a concentraciones por debajo de 1000 p.p.m., por lo que no puede utilizarse como un método para la detección de residuos en un área aséptica.
- En la tabla XXXII se observan los resultados de la detección de ácido acético por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR, siglas en ingles: HPLC), en diferentes superficies aportando respuestas negativas al comparar el cromatógrafo del ácido acético con la muestra tomada de la superficie sanitizada. Esto demuestra que el sanitizante es biodegradable al no dejar residuos de ácido acético en las superficies sanitizadas.

## **DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL SANITIZANTE EN DIFERENTES SUPERFICIES.**

- Al poner en contacto diferentes formulaciones del sanitizante con algunas superficies no se observa ningún efecto físico (tabla XXXII) lo que presenta a la formulación J (formulación final), como la más adecuada para ser utilizada como sanitizante.

## **9. CONCLUSIONES**

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

A) En las pruebas de preformulación para el peróxido de hidrógeno y el ácido acético se obtuvieron las condiciones físicas, químicas y de eficacia adecuadas. Siendo esta última la que determinó como agentes germicidas al peróxido de hidrógeno y al ácido acético.

B) En base a los resultados obtenidos en la etapa de preformulación, se estableció el porcentaje óptimo de los componentes del sanitizante, obteniéndose una formulación final.

C) Al evaluar la formulación final con uno de los productos líderes en el mercado, se obtuvieron resultados satisfactorios. Con esto se demuestra que el sanitizante obtenido puede competir con cualquier otro sanitizante ya que tiene la misma eficacia bactericida. Es un sanitizante de amplio espectro.

D) En los estudios de ciclaje, a diferentes temperaturas y en condiciones de almacenamiento, se observaron cambios físicos que la formulación pudiera presentar. Los resultados mostraron que la formulación es físicamente estable.

Se desarrolló una formulación estable físicamente y económica en relación a los ingredientes, los cuales por sus propiedades fisicoquímicas tienen la característica de ser

**biodegradables, confiriéndole esta propiedad a la formulación obtenida del sanitizante.**

**De acuerdo a las pruebas realizadas con respecto a la detección de residuos del sanitizante y en base a los resultados obtenidos se concluye que existe una alta probabilidad de que el producto obtenido sea biodegradable.**



## **10. COMENTARIOS Y/O SUGERENCIAS**

Se propone realizar más estudios sobre la capacidad biodegradable del sanitizante obtenido.

Validar el método analítico de detección del ácido acético por CLAR.

Realizar estudios de estabilidad acelerada de la formulación propuesta.

Continuar con un escalamiento a nivel piloto del sanitizante.

Proponer nuevas formulaciones, ya sea de los mismos componentes propuestos o de otros que pudieran funcionar como agentes bactericidas.

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Jenkins, K.M., and A. J. Vanderwieelen "Cleaning Validation and Overall Perspective" *Pharm. Tech.*, 18 (4), 60-73 pp (1994).
2. Mendenhall, D.W., "Cleaning Validation" *Drug. Dev. Ind. Pharma.* 15 (13), 2105-2114 pp. (1989).
3. Agalloco, J. "Points to Consider in the Validation of Equipment Cleaning Procedures", *J. Paren. Sci. Tech.* 46 (5), 163-168 pp. (1992).
4. White, X. Thomas, "Terminal Sterilization and Aseptic Processing". *Pharma. Tech.* 52-58 pp. (1992)
5. Turco, Salvatore, y Robert E. King. "Steril Dosage Forms: Their Preparation and Clinical Application" 3a ed. Ed. Lea & Feiber., Philadelphia, U.S.A., 1987., 345-350 págs.
6. Groves, J. Michael, Wayne P. Olson y Michael H. Anisfeld., "Steril Pharmaceutical Manufacturing: Applications for the 1990's" Vol I., Ed. Interpharm Press, Inc., Buffalo Grove, Il. U.S.A., 1991., 147-155 págs.
7. Fourman, G.L. and M.V. Mullen., "Determining Cleaning Validation Acceptance Limits for Pharmaceutical Manufacturing Operations" *Pharm. Tech.* 17 (4), 54-60 págs. (1993).
8. Carleton, F., and James P. Agalloco., "Validation of Aseptic Pharmaceutical Processes", Ed. Marcel Dekker, Inc. Madison Avenue; New York, U.S.A., 1986, 387-409 pp.
9. Groves, J. Michael, Wayne P. Olson y Michael H. Anisfeld., "Steril Pharmaceutical Manufacturing: Applications for the 1990's" Vol II.,

Ed. Interpharm Press, Inc., Buffalo Grove, Il. U.S.A., 1991., 173-215 págs.

10. Wiseman, Alan., "*Principios de Biotecnología*", Ed. Acribia, S.A., Zaragoza, España., 1988.,18-20 págs.

11. Kirsch, Lee E., et al., "*In Process Protein Degradation by Exposure to Trace Amounts of Sanitizing Agents*"., *J. Paren. Sci. Tech.* 42 (4), 155-159 págs., (1993).

12. Jawetz Ernest, et al., "*Microbiología Médica*" 13 ed. Ed. El Manual Moderno S.A., de C.V., México D.f., 1990., 125,174,204-206,215-216, págs.

13. Delaat N.C. Adrian., "*Microbiología General*" 2 ed. Ed. Interamericana; México D.f., 1983., 63-78 págs.

14. Ville A, Claude., "*Biología*" 7a ed. Ed. Interamericana., México D.f., 1986, 18-23 págs.

15. Wilkinson J.F. "*Introducción a la Microbiología*" Ed. H. Blume Ediciones., España., 1976., 126-133págs.

16. Conner D.E., and M.K., Eckman "*Rotation of Phenolic Disinfectans*".*Pharma. Tech.* 148-160pp. (1992).

17. The Merk Index, 10 ed, Ed.Rahway, New Jersey, Merck Co. Inc., 1983.

18. Kleinfelter C. Donald y Jesse H. Wood "*Química General Universitaria*". 3a ed. Ed. Compañía Editorial Continental S.A. de C.V., México D.f., 1986, 154,314,672, 835,842págs.

19. Farmacopea De Los Estados Unidos Mexicanos; Secretaría de Salud. Dirección General de Control De Alimentos, Bebidas y

Medicamentos; México D.F. S.S., Oficina de Coordinación, 1988 5<sup>A</sup> ed.

20. Koneman W. Elmer y Glenn D. Roberts " *Micología: Practicas de Laboratorio*" 3a ed. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina., 1987., 114-116 págs.

21. Jasso M. Pilar, Fuentes V. Santiago y Ortega O. Rubén. "Validación de un aislador para realizar pruebas de esterilidad". *Rev. Méx. Cien. Farma.* 25(4), 82 pp. (1994)

22. Bidlingmeyer A., Brian. "Practical HPLC Methodology And Applications" Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York U.S.A., 40-50 pp. 1992.

23. Baffi R. et al., " A Total Organic Carbon Analysis Method for Validating Cleaning Between Products in Biopharmaceutical Manufacturing" *J. Paren. Sci. Tech.* 45 (1), 13- 19 pp (1991).

24. Bojalil J. Luis Felipe "Microbiología Médica" Ed. Asociación Mexicana de Profesores de Microbiología y Parasitología en Escuelas de Mediana, A.C., México D.f., 369-370 pp.

25. Burrows William "Tratado de Microbiología" 20 ed. Ed Interamericana. México D.f., 188 pp. 1974.

26. Bulnes, C., et al "Toxic Effects of Peracetic Acid. I. Morphopathological Study on the Skin an Mucosa of Guinea Pigs Under Forced Inhalation Conditions" *Rev. Salud. Anim.* 4 (2), 75-84 (1982).

27. Bulnes, C., et al "Toxic Effects of Peracetic Acid. II. Morphopathological Study on the Skin an Mucosa of Guinea Pigs Under Forced Inhalation Conditions" *Rev. Salud. Anim.* 4 (4), 59-65 (1982).

28. Collett, Jeffrey L., et al. "Intensive Studies of Sierra Nevada Coldwater Chemistry and Relationship to Precursor Aerosol and Gas Concentrations." *Atmos. Environ.* Part A. 24 A (7), 1741-1757, 1990, *Chem Abs.* 113, 1990, 158360 d.
29. Crute D. Thomas. "Phenol and the Importance of Dose" *Pharm. Tech.* 69 (7) 553 pp., (1992).
30. De Serves C., Ross H.B., "Comparison of Collection Devices for Atmospheric Peroxides" *Environ. Sci. Tech.* 27 (13), 2712-2718, (1973).
31. Gerald S. Jones Jr. and Jenifer S. Daly "Antibacterial Organosphorus Compounds, Phosphoranilidohydrazones of 5- Nitro-2- Furaldehyde ". *J. Pharma. Sci.* 82 (7), 755-757 pp. (1993)
32. Pecksok, L.Robert y L. Donald Shields., "Métodos Modernos de Análisis Químico" . Ed. Limusa; México D.F., 1983., 333-334 pp.
33. Skoog A. Douglas, y Donald M. West., "Fundamentos de Química Analítica " 2a ed. Ed. Reverte., Barcelona España., 1988., 397-403 pp.
34. Wolfson S. John and David C. Hooper "Quinolone Antimicrobial Agents" Ed. American Society for Microbiology Washinton, D.C. U.S.A. 1989. 41-126 págs
35. Hawley, G. "The Condensed Chemical Dictionary". 10 th ed. New york, Van Nostrand Reinhold Co., 1981., 786 pp
36. Pharm. Chemicals Handbook 1984, Willoughby, Ohio;Meister Publishing Co., 1984., c-174pp.