

26  
29



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

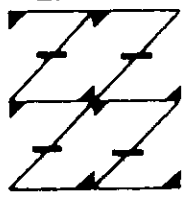
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**EVALUACION DE CUATRO AGENTES  
SANITIZANTES UTILIZADOS EN EL  
CONTROL AMBIENTAL DEL AREA DE  
LLENADO DE POLVOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
GONZALEZ ESPINDOLA ROCIO**

**UNAM  
FES  
ZARAGOZA**



**LO SUMARIO EJE  
DE NUESTRA REFLEXION**

**ASESORES: Q.F.B. FCO. DOMINGO HERNANDEZ HERNANDEZ  
Q.F.B. IRMA ALEJANDRE RAZO**

**MEXICO, D.F.**

50524

1998

**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.

## **DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS.**

*Este trabajo se lo dedico al ser que nunca me ha abandonado y que siempre a estado conmigo, a mi mejor amigo. Dios nuestro señor.*

*Gracias señor. Porque ahora comprendo que todos los golpes que he recibido han sido por mi bien y sé, que a ti también te han dolido. Permíteme solo señor disfrutar de este mi sueño.*

### **A MI QUERIDA Y BIEN AMADA FAMILIA**

*Mis padres: Fernando González Carmona y Albina Espíndola Moreno. Este trabajo se los dedico con todo el amor del que soy capaz, por ser las personas que más me han ayudado, gracias padres no solo por el hecho de haberme dado la vida, si no por la oportunidad que me brindaron de ser yo misma...espero no defraudarlos y que Dios me los preste un poco más de tiempo.*

*Mis hermanos: Guillermina, María Alberta, José Juvenal, Alvaro, Oscar Gabriel y Roberto ( Mi cuñado favorito). Este fruto no solo es mío, sino de todos ustedes, por haberme ayudado en todos los momentos, muchisimas gracias muchachos, espero que la unión que hasta ahora reina entre todos nosotros nunca se rompa, creo que ya saben que ustedes significan mucho para mí y que hay emociones y sentimientos que no se pueden describir así que simplemente gracias...*

*A mis queridas sobrinas Brenda y Valeria, por que a pesar de ser muy ruidosas y latosas, me han dado grandes momentos de felicidad.*

**Posdata  
Los quiero**

*A mi querido tío Pompeyo, que desgraciadamente ya no esta con nosotros, solo me gustaría decirle ¡LO LOGRE!*

**La totalidad de este trabajo fue realizado en los  
Laboratorios Atlantis S. A. de C. V.  
Planta beta lactamicos  
A los que les doy mi sincero agradecimiento por haberme abierto sus  
puertas....Gracias**

**Gracias al QFB Irma Alejandre Razo  
Por haber sido mi asesora y por haberme ayudado a la realización, de este,  
mi sueño**

**Gracias al QFB Fco Domingo Hernández Hernández  
No solo por haber sido mi asesor si no por haberme abierto los ojos a  
muchas cosas que yo desconocía, a través de su agradable charla.**

**A la Facultad de Estudios Superiores ZARAGOZA le doy no solo las  
gracias, también le dejo una parte de mi corazón, muchísimas gracias a la  
UNAM, y a todos los profesores y trabajadores que ayudaron a mi  
formación.**

**A MIS AMIGOS:**

*A los cuales aprecio y quiero de corazón: Balderas Jose Luis, Bernal García Arturo, Carbajal Vargas Guadalupe, Cuadra Martínez Miguel Angel, Díaz Rodríguez Carlos, García Ruiz Armando, Hernández Galindo Ma. Teresa (Teresiña), Hernández Urquiza Nazario, Jiménez Fernández Martha (Martrucha), Jiménez García Priscila, Pérez Ceja Jorge, Ramírez Resendiz Ma. De los Angeles, Rivera Toledo Martín, Robles Medina Tomas, Rodriguez Alvarez Gabriela(Gabirucha), Sánchez Rosas Eric y Urbano García Alejandro.....Gracias por haberme permitido conocerlos y por todos lo momentos tan agradables que hemos pasado juntos, espero sinceramente que la amistad que me une a ustedes dure muchísimo tiempo.*

*A toda la gente que estuvo ahí conmigo, ya sea para regañarme o para apoyarme. A toda la gente que me ayudo dándome valiosos consejos mi agradecimiento eterno, esperando que como con mis padres nunca defraudarlos: al Señor Angel y su esposa Yofanda.*

*Un agradecimiento muy especial al QFB Ma. De Lourdes Hernández García, al QFB Julio R. Resendiz Sánchez y a Teresa Ramírez Lara por toda la ayuda desinteresada que me ofrecieron para llevar a cabo este trabajo. Gracias por haberme escuchado.*

## TABLA DE CONTENIDO.

Introducción.	
1.0 Fundamentación teórica.	1
1.1. Fuentes de contaminación en la industria farmacéutica	1
1.2. Control ambiental.	6
1.2.1. Métodos de muestreo	6
1.2.2. Parámetros que afectan el control ambiental.	9
1.3. Sanitizantes.	10
1.3.1. Definiciones.	10
1.3.2. Clasificación de los sanitizantes.	11
1.3.2.1. Compuestos clorados.	12
1.3.2.2. Compuestos yodados.	14
1.3.2.3. Compuestos cuaternarios de amonio.	15
1.3.2.4. Compuestos fenólicos.	16
1.3.2.5. Compuestos ácido- aniónicos.	17
1.3.2.6. Compuestos de ácidos y álcalis fuertes.	17
1.3.2.7. Agentes anfóteros tensoactivos.	17
1.3.3. Factores que influyen en la actividad de los sanitizantes.	18
1.3.4. Determinación de la actividad microbiana de los Agentes sanitizantes.	18
1.3.4.1. Factores que influyen en la evaluación de los agentes sanitizantes.	19
1.4. Programas de sanitización.	20
1.4.1. Ciclado de la sanitización.	21
2.0 Planteamiento del problema.	22
3.0 Objetivo general.	23
3.1. Objetivos particulares.	23
4.0 Hipótesis.	24
5.0 Material y metodología.	25
6.0 Resultados.	36
7.0 Discusión de resultados.	50
8.0 Conclusiones.	52
9.0 Recomendaciones.	53
10. Anexos.	54
11. Referencias bibliográficas.	59

## **INTRODUCCION.**

Actualmente en la industria farmacéutica es de vital importancia la limpieza y sanitización de las áreas y equipos con los que cuenta el laboratorio farmacéutico, por lo que es necesario evaluar los sanitizantes que utiliza el laboratorio, definiéndose para ello a los sanitizantes como aquel compuesto químico que elimina microorganismos que se encuentran en forma de células vegetativas, reduciendo considerablemente la carga microbiana presente en un área.

Este trabajo se inició al seleccionar cuatro agentes sanitizantes de diferente naturaleza con ciertos requisitos como son, su espectro de actividad, su toxicidad y su corrosividad mínima, así como se buscó que estos agentes sanitizantes sean biodegradables.

Los objetivos de este estudio fueron evaluar la actividad antimicrobiana de los diferentes agentes sanitizantes seleccionados, para posteriormente llevar a cabo un calendario de rotación de los agentes sanitizantes en un área específica, determinando con ello si existe una diferencia significativa entre los agentes sanitizantes aplicados al área de estudio, utilizando un modelo estadístico.

Al término de toda la parte experimental se encontró que los cuatro agentes sanitizantes cumplen satisfactoriamente los requisitos establecidos en la Norma del IMSS (Determinación de la actividad antimicrobiana).

En la determinación del tiempo mínimo de acción se encontró que los agentes con base sal cuaternaria de amonio tienen un tiempo mínimo de acción menor que los otros agentes sanitizantes, así como al aplicar el modelo estadístico se encontró que no existe diferencia significativa entre los agentes sanitizantes evaluados en el área de estudio.

Finalmente se recomendó el seguimiento de este estudio para poder validar los procedimientos de limpieza y sanitización.

**Este trabajo nos da una idea sobre la importancia de los procesos de sanitización y de los sanitizantes, para cualquier área de un laboratorio.**



## **1.0 FUNDAMENTACIÓN TEORICA.**

### **1.1. FUENTES DE CONTAMINACIÓN EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA.**

Dentro de la industria farmacéutica se enlistan las siguientes áreas como fuentes principales de contaminación:

1. Instalaciones.
2. Personal.
3. Equipo.
4. Materias primas y materiales.
5. Agua.
6. Aire. (1, 2, 3, 4)

#### **INSTALACIONES.**

Las áreas estarán diseñadas y construidas de acuerdo al tipo de operaciones a que se destinen, de tal forma que se facilite su limpieza y mantenimiento y se evite la entrada de roedores, basura e insectos. Estos locales deberán cumplir con los siguientes requisitos: (2, 3, 4)

a) Los pisos deberán ser lisos, sin grietas y estar contruidos ó recubiertos con material impermeable o impermeabilizado. Para el recubrimiento de pisos, paredes y techos se utilizarán materiales que resistan a los agentes químicos desinfectantes de fumigación y de limpieza, a fin de que con su uso continuado no generen eventualmente, sino un mínimo de material particulado. (2, 3, 4)

b) Los muros deberán ser de superficie lisa que no desprenda polvo, sin grietas y revestidos o pintados de piso a techo con material impermeable o impermeabilizado. (2, 3, 4)

c) Los techos serán de superficie lisa y unida, sin grietas y deberán haber sido recubiertos de material que no desprenda polvo. (2, 3)

d) Las uniones entre pisos, muros y techos en áreas estériles y de fabricación, deberán ser de tipo sanitario, con un mínimo posible de bordes salientes, las uniones deberán estar terminadas en curvas "media caña" para facilitar su limpieza y las paredes y techos serán pulidas y lisas. (2, 3)

e) Los locales estarán iluminados y ventilados en forma efectiva y deberán contar, en caso de que las áreas así lo requieran, con control de aire, de polvos, de humedad, de temperatura y de luz. (2, 3)

Una vez que se han diseñado cada una de las áreas es necesario que se defina la actividad que se realizara, en cada una de ellas, esto con el fin de prevenir la contaminación cruzada, entendiéndose a esta como la presencia en un producto de entidades físicas, químicas o biológicas indeseables, procedentes de otros procesos de manufactura correspondiente a otros productos. Todo esto con el fin específico de evitar ser una fuente de contaminación. (1, 2, 3)

Deben existir procedimientos escritos que designen la responsabilidad de la sanitización, y describan con detalle suficiente los programas de limpieza, los métodos, equipos y materiales a utilizarse en la limpieza de edificios y servicios, tales procedimientos deben ser seguidos. (1, 4)

## **PERSONAL**

El personal dentro de la industria farmacéutica juega un papel importante como fuente de contaminación debido a su presencia directa sobre el producto. Su movilización dentro y fuera del área, lo constituye como fuente de contaminación por lo que el personal debe cumplir con las siguientes especificaciones: (2, 3, 5)

El personal que opera dentro de una industria farmacéutica debe tener una preparación suficiente y estará al mando de un jefe de área cuya preparación debe ser de grado superior o cuando menos técnico superior. (2)

Todo el personal que entre a las áreas productivas de la planta farmacéutica debe llevar la indumentaria reglamentaria para ingresar a ellas, incluyendo las prendas diseñadas para evitar la contaminación de los productos. Y no podrá entrar a áreas en donde no este asignado. (2, 3)

Al personal que padezca alguna infección o enfermedad contagiosa o bien lesiones abiertas deberá evitársele la entrada a las áreas de trabajo. Por lo que el personal debe practicar hábitos de limpieza. (2)

### **EQUIPO.**

El equipo de una planta farmacéutica debe estar diseñado de acuerdo a la capacidad de producción y debe poder ser limpiado en su totalidad de manera conveniente y sencilla, para evitar ser fuente de contaminación. (2, 3, 5)

Los equipos y utensilios deberán ser limpiados, mantenidos y sanitizados de acuerdo a los requerimientos legales establecidos. (1, 4)

Estas operaciones de limpieza y sanitización deben ser registradas señalando como mínimo lo siguiente:

- ❖ Nombre del equipo.
- ❖ Fecha de la última limpieza y sanitización.
- ❖ Producto que se elaboró así como número de lote.
- ❖ Asignación de la responsabilidad para la limpieza.
- ❖ Frecuencia con que las operaciones de limpieza son efectuadas.
- ❖ Descripción detallada de los pasos a seguir en la limpieza del equipo, así como los utensilios y precauciones necesarias para ello.
- ❖ Descripción de la metodología correcta para la protección del equipo limpio.
- ❖ Nombre y firma de los que realizan los procesos de limpieza y sanitización. (1, 2, 3, 4)

Microbiológicamente, el grado de contaminación de los equipos en una planta farmacéutica, dependerá de la posibilidad de que los microorganismos encuentren condiciones propicias para su desarrollo. La presencia de contaminantes y en particular bacterias gram-negativas, se da con facilidad en espacios muertos (Uniones, juntas, válvulas, etc.), por ello, es importante que las superficies sean lisas y que tengan zonas que se puedan limpiar fácilmente. Los equipos deben ser desmontables. Las partes que tienen contacto con el producto y el medio ambiente deben ser sanitizadas e incluso esterilizadas si así lo requieren.

(1, 2)

### **MATERIAS PRIMAS**

Este punto es sumamente importante ya que las materias primas y los materiales, para evitar ser una fuente de contaminación, se deberán analizar por personal capacitado para poder verificar si cumplen especificaciones así como se deberá validar proveedores. (3)

Para evitar este problema las materias primas y los materiales deberán ser analizados inmediatamente, así como las materias primas que ingresen al área de producción serán solo aquellas que sirvan para efectuar el proceso de producción del producto farmacéutico. (3)

### **AGUA**

El agua en la industria farmacéutica es el elemento más utilizado, es la materia prima más importante de casi todas las formas farmacéuticas líquidas inyectables y no inyectables ya que se usa como vehículo y/o disolvente. También es un agente de limpieza para las áreas y equipos en que se fabrican los medicamentos. El agua puede ser un medio de transporte para un sinnúmero de contaminantes microbiológicos, bacterias como *Pseudomonas sp.*, *Flavobacter sp.*, *Chromobacter sp.* En la industria farmacéutica, además del riesgo que representan en sí las bacterias que contaminan el agua, con frecuencia estas se

tratan de bacterias gram-negativas que son las principales fuentes de pirógenos. (6, 7)

Los aspectos más importantes para el control microbiológico del agua consisten en el tratamiento de acuerdo al uso que ésta tendrá en los procesos industriales como desionización, osmosis inversa, destilación, filtración, suavización, ultrafiltración y radiación ultravioleta; en forma definitiva estos procesos además de purificar el agua de impurezas físicas y químicas también tienen un efecto de reducción del contenido microbiológico. La destilación debido a la elevada temperatura del proceso, es una manera eficaz de reducción de formas vegetativas de microorganismos, sin embargo, cierto número de bacterias termófilas y formas esporuladas resisten el proceso de destilación. (6, 7)

Los deionizadores y los equipos de purificación de intercambio iónico también tienen un cierto efecto en la reducción de microorganismos del agua al hacer desfavorables las condiciones como el pH, sin embargo, se ha observado crecimiento microbiano en la superficie de las mismas resinas de intercambio iónico, lo cual hace necesario un estricto monitoreo de las cuentas microbianas y un adecuado programa de sanitización. (6, 7)

En la elección del sistema que producirá agua potable en el laboratorio farmacéutico es importante el conocimiento de los contaminantes del agua, de los flujos y volúmenes de agua consumidos típicamente y en máximos de producción. (8)

La selección del método de purificación depende de la calidad del agua dura, volumen, requerimientos, facilidades de espacio, capital y costos de operación. (7)

## **AIRE**

El servicio de alimentación de aire deberá ser capaz de satisfacer las condiciones de temperatura y humedad relativa requeridas por en laboratorio. (3)

La clase de aire variará de acuerdo a la naturaleza de los procesos que se lleven a cabo en el laboratorio, ya que se deberá contar con dispositivos adecuados de prefiltración de aire para retener las impurezas mayores a 10 micrones. Posteriormente, este aire prefiltrado se someterá a una filtración a través de filtros cuya calidad sea capaz de proporcionar ambientes con la clase correspondiente a cada zona. (3)

Para satisfacer otros requerimientos, el sistema de aire podrá contar con equipo para calentar, enfriar, humidificar o desecar el aire según las necesidades del proceso. (3)

## **1.2. CONTROL AMBIENTAL**

El muestreo o control ambiental es, la medición ordenada de parámetros que permiten obtener información sobre la condición de una área, proceso o producto. Este control de la contaminación ambiental en la industria farmacéutica, ha sido consecuencia de un proceso evolutivo dentro del control de la producción en la propia industria. (1, 9)

El muestreo ambiental no debe alterar patrones establecidos como los de flujo de aire, operaciones ni ninguna otra condición normal de trabajo, DEBE REPRESENTAR LA SITUACIÓN REAL DEL ÁREA. (5, 9)

### **1.2.1. METODOS DE MUESTREO.**

La detección de contaminantes es un gran problema que frecuentemente requiere de amplia imaginación, dependiendo obviamente de la cantidad de información detallada posible.

El control del ambiente puede efectuarse mediante los siguientes métodos:

## a) METODOS PASIVOS.

**Exposición de placas:** Este es uno de los métodos usados mas ampliamente en el muestreo de microorganismos viables. Se vale de cajas de Petri que contienen medio de cultivo estéril, que favorecerán el desarrollo microbiano, las cuales son expuestas durante un periodo de tiempo en diferentes puntos del área a controlar tanto durante el trabajo, como en el descanso. Su eficacia esta en función del tamaño de partícula, velocidad de deposición y turbulencia del aire. Es un método semicuantitativo. (1, 5, 10) Los criterios de aceptación no existen en una forma universalmente aceptada y los resultados de estos conteos son más bien informativos. (11)

**Raspado con hisopo:** Este método utiliza un lavado de superficies predeterminando áreas de interés de 20x20cm. Estas áreas se lavan por arrastre con un hisopo que no absorba más de 0.5 ml que se impregna en una solución buffer de metafosfato de citrato a pH de 7.2 contenida en un tubo de ensaye el cual contiene aproximadamente 5 ml de esta solución. Después del arrastre se introduce el hisopo dentro de la solución y se agita durante 10 segundos cuando menos. De esta solución se siembran 2 ml por duplicado en cajas de Petri adicionando el medio de agar seleccionado. Incubar a la temperatura deseada por el tiempo requerido. El resultado será la suma de las colonias desarrolladas en las dos cajas. Su eficiencia esta en función de los materiales usados, de la selección de puntos críticos de muestreo y finalmente en la recuperación de la muestra. Esta técnica permite un muestreo más eficaz a áreas de difícil acceso. (1, 5, 7, 10, 12) Los hisopos utilizados generalmente son de alginato de sodio estériles, entre las ventajas con las que cuenta este método es que es sencillo, económico y sirve para superficies irregulares. (10, 13)

## b) MÉTODOS ACTIVOS.

**Impactación en líquidos.** En estos equipos, el aire es aspirado dentro de la unidad por medio del vacío. El volumen de aire aspirado se determina por un orificio capilar limitado. Las

partículas y los microorganismos presentes en el aire, son impactados en el líquido a muy alta velocidad. Al final del periodo de muestreo, la solución en la cual el aire fue impactado es filtrada a través de una membrana. (14)

**Muestreadores por impactación.** El muestreo por impactación en agar emplea una placa giratoria, que contiene un medio soporte, disponible para el desarrollo, bajo un orificio fijo. El volumen de aire muestreado, puede ser relacionado con el nivel de contaminación esperado en el cuarto. El método es portátil, eficiente, tanto cualitativo como cuantitativo, además de proporcionar una concentración en relación con el tiempo y no requiere de subcultivos. Se requiere de una fuente de vacío. Estos modelos tienen una fuente de vacío integrada, lo cual proporciona una gran ventaja, además la unidad puede limpiarse cuidadosamente. Aunque la unidad entera no puede ser esterilizada con vapor, si puede ser sanitizada con agentes apropiados. Algunas partes pueden desmontarse y esterilizarse en forma separada. (14)

**Muestreador Andersen.** Este muestreador es capaz de separar partículas de diferente tamaño y los resultados se expresan por unidad de aire. Aquí el aire es filtrado en un poro específico y los microorganismos son impactados en el medio. No se recomienda cuando la concentración de microorganismos es muy alta y puede ocurrir la superposición de partículas. (14)

**Muestreador centrifuga.** Este equipo opera con un mecanismo que aspira 30 litros de aire por minuto, a través de hojas rotantes. Las partículas en el aire, son arrojadas por fuerzas centrifugas contra una tira con agar nutritivo. El volumen del aire muestreado, debe ser relacionado con los niveles de contaminación esperados en el área. La unidad es portátil, se sostiene con la mano y no requiere de vacío o de una fuente de poder. Algunas partes de este equipo pueden ser esterilizadas con vapor. (14)

**Impactadores en cascada.** Los impactadores tipo cascada son un tipo de colector en donde se impactan las partículas en la caja de Petri y estas caen directamente en el



medio nutritivo solidificado, entre las ventajas con las que cuentan es que no requiere un subcultivo, están provisto de una relación tiempo-concentración y es sensible a altas concentraciones microbianas, pero requieren una aplicación aséptica. (14)

En el caso de las áreas estériles es recomendable hacer una corrida de medios estériles a través del equipo. El costo de esta prueba resulta elevado si se toma en cuenta el tiempo y personal empleado en este proceso. Además se requiere de personal altamente calificado en esta zona ya que en ocasiones el origen de la contaminación puede ser accidental y no proveniente del equipo. (7)

### **1.2.2. PARÁMETROS QUE AFECTAN EL CONTROL AMBIENTAL DE UNA ÁREA.**

- 1) Selección del método de muestreo.
- 2) Capacidad del método de muestreo.
- 3) Instalaciones.
- 4) Calidad del aire, velocidad y flujo.
- 5) Flujo de materiales.
- 6) Flujo y actividades del personal.
- 7) Temperatura.
- 8) Humedad.
- 9) Calidad del agua.
- 10) Condiciones de limpieza y sanitización del equipo y de las áreas.
- 11) Hábitos de higiene del personal. (1, 12, 14)

### **1. 3. SANITIZANTES.**

#### **1. 3.1. DEFINICIONES.**

Se entiende como sanitizante, desinfectante o germicida a aquellos productos principalmente líquidos, conteniendo tensoactivos y/o alcohol, que incorporan agentes antimicrobianos en su composición. (15)

**Agentes antimicrobianos.** Sustancias químicas que inhiben el crecimiento de los microorganismos y eventualmente los destruye. Comúnmente se hace uso de los siguientes términos en relación con los agentes antimicrobianos y su empleo. (16, 17)

**Bacteriostático:** Que tiene la propiedad de inhibir la multiplicación bacteriana; esta se reanuda en cuanto se retira el agente. (17, 18)

**Bactericida:** Que tiene la propiedad de matar a las bacterias. La acción bactericida difiere de la bacteriostasis únicamente en que es irreversible; es decir, el organismo "muerto" no puede reproducirse más, aun cuando sea retirado del contacto con el agente. Las esporas y algunos microorganismos no son eliminados en algunas ocasiones. (17, 18)

**Actividad antimicrobiana.** Propiedad que tiene una sustancia para inhibir o matar a los microorganismos. (15, 16)

**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 como equipos y utensilios. Durante los fenómenos de sanitización se reduce la población de microorganismos dependiendo de las operaciones de sanitización que se lleven cabo. (18,19, 20)

Las soluciones sanitizantes son clasificadas como aditivos indirectos siendo reguladas bajo CFR 21 Sec. 178.1010. Las soluciones sanitizantes son aditivos indirectos porque sus componentes son razonablemente expuestos a superficies del equipo o área tratadas. El uso de una solución sanitizante requiere la aplicación con la superficie de contacto. Para su utilización es muy importante la dilución, ya que para que un sanitizante sea efectivo debe serlo aún en mínimas concentraciones. (21)

**Desinfectantes.** Es un agente químico que destruye gérmenes u otros microorganismos o inactiva virus. La mayoría de los

compuestos usados elimina las formas normales, pero no necesariamente elimina las formas esporuladas de la bacteria. (16, 17, 20) El efecto de un desinfectante es el de reducir el número de bacterias patógenas y así eliminar una subsecuente colonización. (22)

**Antiséptico.** Producto químico que se emplean sobre tejidos para prevenir la infección o putrefacción. (16, 17)

**UFC.** Unidad formadora de colonias. Dado que una bacteria que se siembra en un medio de cultivo sólido quedará prácticamente fija y al reproducirse dará origen a millones de células reunidas en una masa observable a simple vista, a este conglomerado de bacterias se le conoce como "colonia bacteriana" y posee características morfológicas útiles para el aislamiento primario de la bacteria que le dio origen. (16)

El principal control que se le debe hacer a estas soluciones es la determinación de la actividad antimicrobiana, ya sea por la prueba de reto microbiano y/o la prueba de coeficiente fenólico. (1, 10, 16)

### **1.3.2. CLASIFICACIÓN DE LOS SANITIZANTES.**

En nuestro país se ha incrementado en los últimos años el uso de sanitizantes que son capaces de eliminar o inhibir microorganismos, debido a su estructura y formulación química. Dentro de los cuales se encuentran los siguientes:

- ◆ Compuestos Clorados.
- ◆ Compuestos Yodados.
- ◆ Compuestos Cuaternarios De Amonio.
- ◆ Compuestos Fenólicos.
- ◆ Compuestos Acido-Aniónicos.
- ◆ Compuestos De Ácidos Y Alcalis Fuertes.
- ◆ Agentes Anfóteros Tensoactivos.

Esta gran variedad de agentes químicos representan una serie de opciones para cubrir las distintas necesidades para mantener áreas, procesos y servicios en condiciones higiénicas aceptables. Sin embargo en particular cada uno de estos sanitizantes presentan ventajas y desventajas que los hacen viables para su utilización, teniendo como objetivo principal el costo-beneficio para las empresas. (23)

### 1.3.2.1. COMPUESTOS CLORADOS.

Estos compuestos si se utilizan debidamente, pueden considerarse entre los mejores para los establecimientos ya que existe una gran variedad y es probablemente la forma más popular de los sanitizantes, tienen un efecto rápido sobre una gran variedad de microorganismos y son relativamente baratos; este grupo de sanitizantes corroe los metales y produce además efectos decolorantes debido a su poder oxidante. Entre sus propiedades es que es relativamente no tóxico al usarlo en las concentraciones adecuadas, es incoloro, fácil de preparar y de usar, es económico. ( 15, 24, 25)

El cloro como tal no tiene poder bactericida, el poder bactericida lo da el ácido hipocloroso que se forma de acuerdo a la siguiente reacción: (24, 26)



La disociación del ácido hipocloroso depende del pH. (26)

El ácido hipocloroso es el agente activo de todos los agentes clorados lo que les confiere la particularidad de ser fuertes agentes oxidantes a la vez de ser agentes bactericidas. (24)

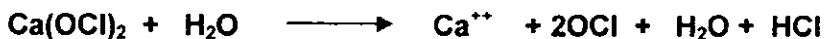
A pHs de 4.0 la reacción se desplaza a la derecha y no hay descomposición del ácido hipocloroso y por lo tanto la solución tiene su máximo poder bactericida; por el contrario a pHs cercanos a 10 casi todo el HOCl se descompone de la siguiente manera:



Donde ni el  $\text{H}^+$  ni  $\text{OCl}^-$  tienen poder bactericida. (24, 26)

Por lo tanto para poder regular la actividad de un sanitizante clorado se debe tener cuidado con el manejo del pH. (24, 26)

Entre los compuestos clorados se encuentran al hipoclorito de calcio y el hipoclorito de sodio, estos compuestos al ser disueltos con agua ocasionan una disminución de pH formando ácido hipocloroso. (18)



El hipoclorito de sodio es el compuesto clorado que más se usa, la solución concentrada de sodio tiene una vida media la cual esta entre 1 y 90 días, el cloro granular es un agente sanitizante el cual se obtiene de un portador orgánico, el cual facilita los iones cloro. El dióxido de cloro es muy usado en el agua y tratamientos de esta. (24)

Los compuestos clorados tienen múltiples beneficios, ya que tienen una actividad microbiana rápida contra una gran variedad de microorganismos y tienen un efecto contra las bacterias esporuladas. Ya que tiene una gran reactividad, se ha confirmado que el efecto bactericida de los compuestos clorados es producido por la inhibición de ciertas enzimas esenciales para la vida de las bacterias. Ocasionando una acción oxidante de los compuestos clorados con los grupos  $-\text{SH}$  de las enzimas, esta reacción es aparentemente irreversible, ocasionando la muerte de la bacteria. (24, 26)

Entre las desventajas de este tipo de compuestos se cuentan que son deteriorados durante su exposición con luz y su eficacia disminuye rápidamente a pH entre 6 y 7 además es corrosivo de aceros y otros metales, además es irritante a la piel. (24)

### 1.3.2.2. COMPUESTOS YODADOS.

Estos compuestos contienen Yodo es estado elemental y ácido hipoyodoso, los cuales son los que tienen función antimicrobiana. La solución alcohol-Yodo es usada como desinfectantes de la piel. (24)

El yodo es un sólido corrosivo, que se sublima a presión atmosférica convirtiéndose en gas. Es muy poco soluble en agua y sus soluciones poseen un color café cuyo tinte depende de la concentración. En su fórmula comercial se le añade yoduro para proporcionarle estabilidad y solubilidad. (24)

Estos compuestos siempre se mezclan con un detergente en medio ácido, por lo que son muy convenientes en los casos en que se necesite un limpiador ácido. Pierden su eficacia con materia orgánica y es posible observar visualmente la eficacia de los yodados, ya que pierden color cuando el yodo residual ha bajado a niveles ineficaces. (15)

El yodo ( $I_2$ ) en presencia de agua y a un pH entre 7 y 9 forma el ácido hipoyodoso:



Tanto el ácido hipoyodoso como el yodo tienen poder bactericida similar, sin embargo a pH mayor de 9 el HIO se descompone en  $H^+$  y en  $OI$ , los que no tienen poder bactericida, no obstante el efecto del pH en el poder bactericida del yodo no es tan marcado como el caso del cloro. (24)

Este tipo de compuestos se utilizan en la sanitización de utensilios, equipos y como antiséptico de la piel, también ayuda a

prevenir depósitos de minerales. El color ámbar de las soluciones yodadas nos ayuda como evidencia visible de la presencia del sanitizante y la presencia de la mancha de yodo puede ser usada como detector de un lavado ineficiente. La intensidad de las manchas de la solución yodada depende de su concentración. También se ha encontrado que concentraciones muy altas de compuestos yodados producen un significativo declive en el número de colonias sobrevivientes lo que ocasiona que los compuestos yodados se manejen en concentraciones altas, ocasionando manchas amarillas en áreas o equipos. (24, 27)

Este tipo de compuestos son menos irritantes a la piel y menos corrosivos para los metales que los compuestos clorados y no se ven afectados por dilución con materia orgánica, también reaccionan con una gran variedad de formas esporuladas y no esporuladas, el uso de un compuesto yodado se ve favorecido a un rango de pH de 2.5 a 3.5, no se debe usar a temperaturas que excedan 50°C. (24)

Los compuestos yodados destruyen a los microorganismos por oxidación de los grupos químicos -SH de las enzimas. (25)

Numerosos agentes orgánicos e inorgánicos tienen reportados que neutralizan los efectos de los compuestos yodados entre estos compuestos tenemos a la glicerina al 5%, al tiosulfato de sodio, el mercurio metálico y el amoníaco. (22, 28)

### **1.3.2.3. COMPUESTOS CUATERNARIOS DE AMONIO.**

Estos compuestos presentan también buenas características detergentes. Son incoloros, relativamente no corrosivos de los metales y no son tóxicos, pero tienen sabor amargo. Usado en las concentraciones requeridas es no tóxico, es estable en calor y en presencia de materia orgánica (15, 25)

Estos compuestos son surfactantes catiónicos usados en suelos, paredes y equipos de aluminio, estos son generalmente considerados como de buena penetración, con una actividad rápida aun a bajas concentraciones, son buenos agentes

humectantes con buenas propiedades detergentes. Una aplicación de estos compuestos en los equipos tiene un tiempo de sanitización que excede de las 24 horas. (24)

El mecanismo de este tipo de compuestos no es conocido aun, pero sean asociado con inactivación enzimática, daño y desnaturalización de proteínas celulares y rompimiento de la membrana celular. Algunas ventajas de estos compuestos son que tienen un rango de pH más largo (6-10) así como soportan temperaturas altas, son efectivos contra la mayoría de los organismos especialmente gram-positivos, no son corrosivos contra los metales y son estables en presencia de materia orgánica, pero tienen sus limitantes ya que su actividad contra organismos gram-negativos es limitada. (24, 29)

#### 1.3.2.4. COMPUESTOS FENÓLICOS.

Los sanitizantes fenólicos son usados para controlar infecciones y como sanitizantes de algunos objetos, primeramente por inactivación de la microflora asociada con la superficie del objeto. Los compuestos fenólicos tienen un amplio espectro de actividad y su mecanismo de acción es la destrucción de la membrana celular y no sé a especificado si estos compuestos atacan material citoplásmico. (30, 31)

Los compuestos fenólicos cuando se usan contra *E. coli* simulan la oxidación de la glucosa y del succinato de sodio lo que provoca la muerte de *E. coli* por la inhibición del metabolismo aeróbico o anaerobio de la glucosa, también daña la membrana celular, pero no es posible establecer el orden en que ocurren los fenómenos. (32)

Existe una desventaja en la frecuencia de uso de los sanitizantes ya que la microflora puede desarrollar una resistencia por lo tanto debe de existir un programa de rotación, por lo tanto se recomienda utilizar un protocolo de sanitizantes, estos pueden ser rotados durante un tiempo, sobre la base de los problemas que se estén combatiendo. (30)



### **1.3.2.5. SANITIZANTES ÁCIDO-ANIÓNICOS.**

Este tipo de compuestos son surfactantes aniónicos usados como antimicrobianos especialmente en sistemas de limpieza automatizado, en combinación del sanitizante con el enjuague final. Los sanitizantes ácido-aniónicos son combinaciones de ácidos orgánicos o inorgánicos con agentes aniónicos surfactantes, el surfactante más usual es el alquil-sulfonato. El ácido fosfórico es el que con mayor frecuencia se usa en estos compuestos. Los sanitizantes ácido-aniónicos tienen su máximo poder antimicrobiano a un pH de alrededor de 3.0, eliminando a los microorganismos por ruptura de la membrana celular y por alteración de la permeabilidad de la célula. (24, 25)

Estos compuestos aniónicos son particularmente usados para los metales y pueden prevenir el depósito de minerales y la neutralización excesiva de los compuestos alcalinos, sus ventajas son que se pueden utilizar en el enjuague final, es rápida su actividad contra la mayoría de los microorganismos, es muy bajo su efecto corrosivo y resisten la materia orgánica y las sales del agua, pero estos tipos de sanitizantes pueden ser contaminados por agua alcalina y su actividad disminuye con incrementos de pH. (24)

### **1.3.2.6. ÁCIDO Y ÁLCALIS FUERTES.**

Además de sus propiedades detergentes, los ácidos y álcalis fuertes tienen considerable actividad microbiana. Debe tenerse especial cuidado de que no contaminen al producto. Estos agentes modifican el pH del medio acidificándose o alcalinizándose de tal manera que no sea el adecuado para el desarrollo de la vida bacteriana. (15, 24)

### **1.3.2.7. AGENTES ANFÓTEROS TENSOACTIVOS.**

Este tipo de desinfectante consta de un agente activo con propiedades detergentes y bactericidas, son de baja toxicidad,

relativamente no corrosivos, insípidos e inodoros. Pierden su eficacia con material orgánico. (12)

### **1.3.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD DE LOS SANITIZANTES.**

- 1) **Inactivación debida a la suciedad:** La presencia de suciedad y otros materiales sedimentados reducen la eficacia de todos los desinfectantes químicos. Cuando hay mucha suciedad los desinfectantes no surten ningún efecto.
- 2) **Temperatura de solución:** En general cuando más alta sea la temperatura más es la desinfección, por lo tanto es preferible usar, una solución desinfectante tibia o caliente, que una fría.
- 3) **Tiempo:** Todos los desinfectantes químicos necesitan un tiempo mínimo de contacto para que sean eficaces.
- 4) **Concentración:** La concentración de la solución es necesaria y variara de acuerdo con las condiciones de uso, además deberá ser adecuada para la finalidad a la que se destine el sanitizante.
- 5) **Estabilidad:** Todas las soluciones desinfectantes deberán ser de preparación reciente.
- 6) **Precauciones:** Los desinfectantes químicos que pueden envenenar los alimentos o los productos no deben usarse en las fábricas de elaboración de alimentos, ni en vehículos para su transporte. (15, 17, 18 33)

### **1.3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS AGENTES SANITIZANTES.**

La determinación antimicrobiana se mide in vitro para determinar:

1. **Potencia de un agente antibacteriano en solución.**
2. **Concentración en los líquidos del cuerpo o en los tejidos.**
3. **Sensibilidad de un microorganismo dado a concentraciones conocidas.**

La medición de estas cantidades puede realizarse por uno de los siguientes dos métodos principales, dilución y difusión. Utilizando un microorganismo estándar apropiado de prueba. (17)

**A. Pruebas de dilución:** Se incorporan cantidades graduadas de las sustancias antimicrobianas en medios bacteriológicos líquidos o sólidos; los medios se inoculan después con las bacterias de prueba y se incuban. El punto final se toma como la cantidad de sustancia antimicrobiana requerida para inhibir el crecimiento, o para matar a las bacterias de prueba. (17, 34)

**B. Método de difusión:** Este se basa en la difusión de la sustancia de prueba contenida en un cilindro vertical o disco de papel filtro, a través de una capa de agar solidificado en una caja Petri o placa. Se coloca un disco de papel filtro, una capa porosa o un cilindro sin fondo, conteniendo cantidades medidas del antimicrobiano sobre un medio sólido que ha sido sembrado en forma abundante con el microorganismo de prueba. Después de la incubación se toma el diámetro de la zona clara de inhibición que rodea al depósito del agente de prueba, como medida del poder inhibitor de ella contra el microorganismo de prueba particular. Entre los factores que afectan el halo se encuentran la concentración del producto de prueba, el tipo de cepa(microorganismo específico), la temperatura, el tiempo de incubación, el inoculo y el tamaño del reservorio. (17, 35, 36)

#### **1.3.4.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EVALUACIÓN DE AGENTES SANITIZANTES.**

- pH del medio.
- Medios de cultivo seleccionados.
- Componentes del medio.
- Estabilidad del agente sanitizante.
- Tiempo de contacto.
- Tamaño del inoculo.
- Duración de la incubación.
- Actividad de los microorganismos.
- Concentración del agente sanitizante. (17, 18, 32)

#### **1.4. PROGRAMAS DE SANITIZACIÓN.**

Los programas de sanitización son implementados para remover los contaminantes no deseados. En la manufactura farmacéutica los residuos no deseados son típicamente los restos de los productos manufacturados anteriormente, pero también se incluyen partículas y endotoxinas. (37)

Estos programas cuentan invariablemente de cuatro pasos.

1. Un preenjuague con agua a baja presión para remover desechos de gran tamaño. Este es un lavado rápido con agua caliente, a 65°C, ya que a esta temperatura el crecimiento microbiano y la contaminación son mínimos. (24, 38)
2. Utilización de un detergente para remover físicamente la suciedad. Definiendo a los detergentes como mezclas de tensoactivos, secuestrantes, conservadores y agentes amortiguadores, que tienen la particularidad de limpiar un objeto sin causar abrasión ni corrosión. (24, 28)
3. Otro enjuague para remover el detergente y la suciedad remanente. (38)
4. Aplicación de sanitizantes los cuales prevén la recontaminación durante el proceso. (38)

El agua funciona como un vehículo para detergentes o sanitizantes, pero también es un vehículo de suciedad o contaminantes. La calidad del agua varía en función de su uso, ya que un factor de primera importancia en los programas de limpieza y sanitización es el uso del agua, ya que si se utiliza agua dura por ejemplo se gastaría más detergente. (24)

Para que un detergente sea efectivo debe cumplir con:

- 1) Debe mojar y penetrar la suciedad.
- 2) Debe tener emulsificantes.
- 3) Debe poder dispersarse y debe suspender la suciedad.

#### **4) Debe contrarrestar el agua dura.**

En suma debe enjuagar y prevenir la suciedad y no debe ser corrosivo para el equipo. Actualmente existen diferentes agentes limpiadores los cuales son formulados de acuerdo al tipo de limpieza que se va a llevar a cabo. (24)

La adecuada sanitización de las áreas debe ser realizada de tal manera que proteja debidamente todas las superficies del área, las superficies externas de los equipos y de todo aquel material de trabajo normal que se encuentre dentro del área. La sanitización se ve enfocada prioritariamente al ataque de los posibles microorganismos que puedan encontrarse depositados o adheridos a las partes anteriormente enunciadas. (3)

#### **1.4.1. CICLADO DE LA SANITIZACIÓN.**

La sanitización se realizará utilizando agentes químicos de diverso origen, pero que tenga siempre un poder bactericida demostrado. Dado que muchos microorganismos pueden crear resistencias al ataque de estos agentes químicos, es recomendable el ciclado de los mismos. Este ciclado usará alternadamente agentes químicos que utilicen radicales químicos distintos para ejercer su acción, ya que esto dificulta la aparición de microorganismos resistentes. Estos sanitizantes deben ser rotados sobre la base de los problemas que se están generando, existiendo evidencia documentada de esta rotación. (3, 31, 32)

## 2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El control ambiental dentro de un laboratorio farmacéutico ha sido la consecuencia de un proceso evolutivo hacia la calidad de un producto, ya que es un monitoreo que se lleva a cabo para determinar las cantidades y tipos de contaminantes microbiológicos presentes en las diferentes áreas del laboratorio.

Se ha demostrado que los procedimientos de limpieza y sanitización reducen las biocargas encontradas durante los monitoreos ambientales, a la vez se ha descubierto que algunos microorganismos pueden crear resistencia a los agentes sanitizantes, por lo que se recomienda la utilización de diferentes agentes sanitizantes mediante un programa de rotación de los mismos.

Por lo anterior en el presente proyecto se plantea la utilización de un programa de rotación de cuatro agentes sanitizantes a los cuales se les haya demostrado su poder bactericida, para posteriormente observar si existe diferencia significativa entre los tratamientos manejados, utilizando el porcentaje de reducción de las UFC encontradas en el área de producción de llenado de polvos; manejando para este estudio el modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_j(i)$$

### 3.0 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar cuatro diferentes agentes sanitizantes utilizados para el control ambiental del área de llenado de polvos.

### 3.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

-Seleccionar los diferentes agentes sanitizantes a utilizar basándonos para ello en sus grupos funcionales y en sus características químicas biológicas y tóxicas.

- Determinar la actividad antimicrobiana a los diferentes agentes sanitizantes seleccionados utilizando para ello la norma general del IMSS.

- Desarrollar el monitoreo ambiental por el método pasivo de raspado con hisopo utilizando un calendario de rotación de sanitizantes.

- Determinar la biocarga encontrada en los diferentes puntos de muestreo a tiempo cero y con los diferentes agentes sanitizantes.

- Analizar los resultados obtenidos basándonos en el modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{j(i)}$$

#### 4.0 HIPOTESIS.

Si a cuatro diferentes agentes sanitizantes utilizados en el monitoreo ambiental del área de llenado de polvos se les demuestra su actividad antimicrobiana, determinando con ello el tiempo de exposición, se podrá prevenir con esto que los microorganismos generen resistencia a los sanitizantes, utilizando para ello la rotación de estos agentes, así como se podrá determinar que no habrá una diferencia significativa en cuanto a su actividad antimicrobiana, utilizando como variable de respuesta el porcentaje de reducción de las UFC encontradas durante los diferentes monitoreos, dentro del diseño estadístico el cual presenta el siguiente modelo:  $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{j(i)}$



**5.0 METODOLOGIA.**

**Reactivos, medios de cultivo, instrumentos, equipo, microorganismos, material y determinaciones.**

**REACTIVOS****MARCA**

Hidróxido de sodio	J. T. Baker
Fosfato de potasio monobásico	Tecsiquim
Etanol	Tecsiquim
Acido clorhidrico	J. T. Baker
Azolecitina	J. T. Baker
Polisorbato 80	J. T. Baker
Citrato de metafosfato	Dequinsa
Hisopos de alginato de sodio	

**MEDIOS DE CULTIVO****MARCA**

Agar soya tripticaseína	Becton Dickinson
Agar para método estándar	Bioxon
Agar nutritivo	Bioxon

**INSTRUMENTOS****MARCA****MODELO**

Espectrofotometro	Perkin-Elmer	Lambda 25
Potenciometro	Beckman	Zeromotic II/96A
Balanza analítica	Ohaus	E/2/40

**EQUIPO****MARCA****MODELO**

Autoclave	AESA	CV250
Incubadora	Felisa	130
Cuenta colonias	Mayasa	0483
Refrigerador	Philips	PH 907 P7
Cronometro	General Electric	10-88
Horno	Kinet	B353
Campana de Flujo Laminar	Veco	84

MICROORGANISMO	ATCC (American Type Culture Collection)
<u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	6538
<u><i>Escherichia coli</i></u>	11229

MATERIAL	CANTIDAD
Matraces aforados 500 ml	2
Matraces aforados 100 ml	4
Matraces Erlenmeyer 500 ml	3
Matraces Erlenmeyer 250 ml	8
Cajas Petri 60x10 mm	50
Tubos de ensaye 16x125 mm	15
Tubos de ensaye 22x175 mm	15
Pipetas graduadas 5 ml	3
Pipetas graduadas 2 ml	2
Pipetas graduadas 1 ml	2
Termómetro	4
Vasos de precipitado 250 ml	3
Frascos muestrales 100 ml	10
Mechero fischer	2
Gradilla metálica	1

#### PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.

##### *Agar soya tripticaseína*

Digerido pancreático de caseína	15.0 g
Digerido papainico de soya	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 ml

Preparar siguiendo las instrucciones del fabricante, esterilizar a 121° C durante 15 minutos.

**Agar para método estándar.**

Peptona de caseína	5 g
Extracto de levadura	2 g
Dextrosa	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Preparar siguiendo las instrucciones del fabricante, esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

**Agar nutritivo**

Extracto de carne	3 g
Peptona de gelatina	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Preparar siguiendo las instrucciones del fabricante, esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

**Solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M**

Fosfato monobásico de Potasio.

Solución de hidróxido de sodio 1N

En un matraz volumétrico de 1000 ml disolver 34 g de fosfato monobásico de potasio en 500 ml de agua, ajustar el pH entre 7.1 y 7.3 utilizando una solución de NaOH 1N, llevar a volumen con agua mezclar y distribuir en porciones de 100 ml, esterilizar a 121°C por 15 minutos y conservar en refrigeración.

**Solución amortiguadora de fosfatos diluida.**

Colocar 1.25 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M en un matraz volumétrico de 1 litro y llevar a volumen con agua, mezclar y distribuir en porciones de 9 ml y 99 ml, en tubos y matraces respectivamente, esterilizar a 121°C por 15 minutos.

**Solución Neutralizante Concentrada**

Azolecitina (Lecitina de soya)

Polisorbato 80

Solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M

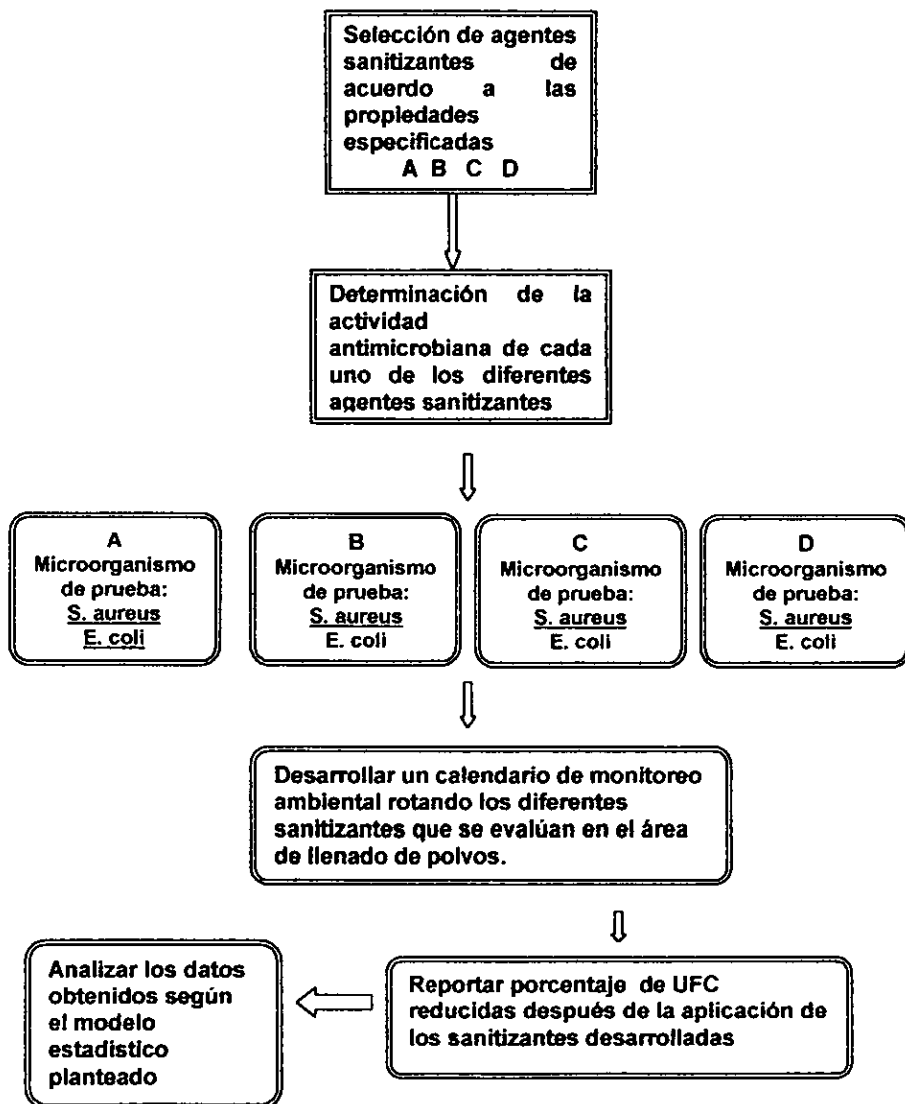
**Hidróxido de sodio 1N**

**Acido clorhídrico 1N**

**Mezclar 40g de azolecitina con 280 ml de polisorbato 80 y 1.25 ml de la solución amortiguadora de fosfatos, diluir con agua hasta obtener un volumen final de un litro, ajustar pH a 7.2 con NaOH o HCl 1N distribuir en porciones de 100 ml. Esterilizar a 121°C durante 20 minutos.**

***Solución neutralizante diluida***

**Mezclar 100 ml de la solución neutralizante concentrada con 25 ml de la solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M, adicionar 1675 ml de agua, mezclar y distribuir en porciones de 9 ml en tubos con rosca de 20 mm x 150 mm. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.**



**Fig. 1. Diagrama de actividades para la evaluación de cuatro agentes sanitizantes utilizados en el control ambiental del área de llenado de polvos.**

## SELECCIÓN DE AGENTES SANITIZANTES.

Para elegir los sanitizantes a emplear dentro de este proyecto nos basaremos en los siguientes criterios.

1. Tipo de agente (Naturaleza química del mismo).
2. Espectro de actividad.
3. Diluciones.
4. Toxicidad.
5. Corrosividad.
6. Propiedades biológicas.
7. Si requieren o no, enjuague después de su aplicación.

## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Condiciones:

Los instrumentos deber estar debidamente calibrados.

El agua empleada debe ser recientemente destilada, a menos que se indique otra pureza.

El material de vidrio debe ser de borosilicato de bajo coeficiente de expansión térmica.

Los reactivos utilizados en la preparación de las soluciones de prueba deben ser grado reactivo a menos que se indique otro grado.

## METODOLOGÍA.

### MICROORGANISMOS DE PRUEBA.

Utilizar los siguientes microorganismos para efectuar la prueba:

Microorganismos	ATCC
<u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	6538
<u><i>Escherichia coli</i></u>	11229

***Conservación de los microorganismos de prueba.***

Conservar las cepas de microorganismos resembrándolas periódicamente en tubos con medio de cultivo inclinado de 16mm x 125mm, que contenga 7 ml de agar nutritivo, incubar a una temperatura de (35-37°C) por periodos de 20 a 24 horas, transcurrido este tiempo mantener los cultivos en refrigeración. (16)

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

Antes de realizar la prueba de actividad antimicrobiana, efectuar 2 resiembras diarias consecutivas e incubar en las condiciones señaladas. A partir de estos cultivos resembrar 3 tubos de 22 mm x 125 mm que contengan 12 ml de agar nutritivo inclinado e incubar en las condiciones antes señaladas. Remover el crecimiento de cada tubo, con 3 ml de la solución amortiguadora de fosfatos diluida, transferir el sobrenadante a un tubo de ensayo estéril y continuar diluyendo con la misma solución hasta obtener una suspensión que leída a una longitud de 580 nm, dé una lectura entre 3% y 5% de transmitancia. (16)

**MÉTODO DE PRUEBA.*****Determinación de la actividad antimicrobiana.******Determinación de la cuenta viable control.***

A dos matraces Erlenmeyer conteniendo 99 ml de la solución amortiguadora de fosfatos diluida, transferir 1 ml de la suspensión de los microorganismos de prueba y efectuar las diluciones decimales necesarias para obtener placas que contengan cada una, entre 25 y 250 colonias. (16)

***Preparación de la muestra de sanitizante.***

Si es necesario, efectuar las diluciones pertinentes con agua para llevar el producto problema a la concentración de uso indicada por el fabricante. (16)

***Inoculación de la muestra de sanitizante.***

Medir exactamente y por duplicado 99 ml del producto o su dilución, transferir a matraces Erlenmeyer de 250 ml con tapón de

rosca. Agitar los matraces, (suspender la agitación, justamente antes de la inoculación, para que, en el momento de la misma aún exista movimiento residual del líquido y así facilitar la incorporación del inóculo). Inocular la suspensión del microorganismo de prueba en el centro de la superficie del líquido, evitando tocar el cuello o las paredes con la pipeta durante la inoculación. (16)

***Determinación de las células sobrevivientes.***

Agitar el matraz con la muestra y exactamente 30 segundos, después de la inoculación transferir 1 ml, a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de la solución neutralizante diluida, mezclar y transferir por duplicado alícuotas de 1 ml a cajas de Petri estériles, y continuar diluyendo hasta obtener las diluciones necesarias requeridas, agregar a cada caja de Petri de 15 a 18 ml de agar para método estándar con neutralizante (El medio se prepara en forma convencional y antes de su esterilización agregar 25 ml de la solución neutralizante concentrada), homogeneizar, permitir que solidifique, invertir las placas e incubar durante 48 horas a 35-37°C. (16)

***Reporte de resultados.***

Promediar los resultados de las placas y calcular el % de reducción.

***Cálculos.***

Utilizar la siguiente fórmula para calcular el % de reducción.

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

Donde:

C.V. : Cuenta viable control UFC/ml

S : Cuenta problema UFC/ml

Informar el porcentaje de reducción obtenido en la muestra del producto. El producto a probar debe cumplir con el valor de efectividad del 99.999% de reducción a los 30 segundos de contacto.



***Determinación del tiempo mínimo de acción.******Determinación de la cuenta viable control.***

A dos matraces Erlenmeyer conteniendo 99 ml de la solución amortiguadora de fosfatos diluida, transferir 1 ml de la suspensión de los microorganismos de prueba, agitando. Sembrar por duplicado 1 ml de esta solución a cajas Petri adicionando de 15 a 18 ml de agar para método estándar. <sup>(16)</sup>

***Preparación de la muestra de sanitizante.***

Si es necesario, efectuar las diluciones pertinentes con agua para llevar al producto problema a la concentración de uso indicada por el fabricante. <sup>(16)</sup>

***Inoculación de la muestra de sanitizante.***

Medir exactamente y por duplicado 99 ml del producto o su dilución, transferir a matraces Erlenmeyer de 250 ml con tapón de rosca. Agitar los matraces, (suspender la agitación, justamente antes de la inoculación, para que, en el momento de la misma aún exista movimiento residual del líquido y así facilitar la incorporación del inóculo). Inocular con 1 ml de la suspensión del microorganismo de prueba en el centro de la superficie del líquido, evitando tocar el cuello o las paredes con la pipeta durante la inoculación. <sup>(16)</sup>

***Determinación de las células sobrevivientes.***

Agitar el matraz con la muestra y exactamente a los diferentes tiempos 30 segundos, 1, 2, 5, 7, 10 y 20 minutos después de la inoculación transferir 1 ml por duplicado a cajas de Petri estériles, agregar de 15 a 18 ml de agar para método estándar con neutralizante, homogeneizar, permitir que solidifique, invertir las placas e incubar durante 48 horas a 35-37°C. <sup>(16)</sup>

***Reporte de resultados.***

Promediar los resultados de las placas y calcular el % de reducción.

**Cálculos.**

Utilizar la siguiente fórmula para calcular el % de reducción.

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

Donde:

C.V. : Cuenta control de la suspensión de los microorganismos de prueba

S : Células sobrevivientes

Informar el porcentaje de reducción obtenido en la muestra del producto.

### CALENDARIO DE MUESTREO PARA LOS DIFERENTES AGENTES SANITIZANTES A ENSAYAR.

En base al procedimiento de limpieza y sanitización del área de llenado de polvos (Anexo 1) se desarrolló el siguiente calendario de rotación de los agentes sanitizantes.

		SEMANA															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
S-A	X					X				X				X			
S-B		X					X				X				X		
S-C				X				X				X				X	
S-D					X				X				X				X

S= Sanitizante

Tabla 1. Calendario de muestreo de los agentes sanitizantes.

### MONITOREO AMBIENTAL.

Este se llevó a cabo por un método pasivo (raspado con hisopo) muestreando en los siguientes puntos críticos del área de llenado de polvos.

Entrada

Centro

Uniones pared - pared

Este es uno de los métodos usados mas ampliamente en el muestreo de microorganismos viables.

1. Se colocaron cajas Petri conteniendo el medio agar soya tripticaseína en el área a analizar, en las zonas especificadas anteriormente a tiempo 0, sin que el área este sanitizada.
2. Se retiraron estas cajas pasados 60 minutos.
3. Se desarrolló el Procedimiento Estándar de Operación de llimpieza y sanitización del área de llenado de polvo (anexo 1), sanitizando el área con el agente específico de acuerdo al calendario de muestreo descrito anteriormente.
4. Metodología del Raspado con hisopo: Se llevó a cabo un lavado de superficies predeterminando áreas de interés de 20x20cm (Dentro de los puntos críticos). Estas áreas se lavaron por arrastre con un hisopo de alginato de sodio previamente impregnado en una solución buffer de metafosfato de citrato a pH de 7.2 contenida en un tubo de ensaye el cual contiene aproximadamente 5 ml de esta solución. Después del arrastre se introduce el hisopo dentro de la solución y se agitó durante 10 segundos cuando menos.
5. De esta solución se sembraron 2 ml por duplicado en cajas de Petri adicionando agar soya tripticaseína. Incubando a 36°C por 24 horas.
6. Reportar por ciento de reducción tomando como 100% las cajas que se colocaron en el área a tiempo cero.
7. Se desarrolló el modelo estadístico  $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{j(i)}$  con los resultados generados a lo largo de los monitoreos.

## 6.0. RESULTADOS.

### Selección de agentes sanitizantes

Para la elección de los agentes sanitizantes se utilizaron los siguientes criterios (Tipo de agente, espectro de actividad, toxicidad, si requiere o no enjuague después de su aplicación, corrosividad, propiedades biológicas y su dilución), generándose la siguiente tabla:

SANITIZANTE	1	2	3
NATURALEZA	Base fenólica	Base sal cuaternaria de amonio	Base yodada
ESPECTRO DE ACTIVIDAD	<u>Trichophyton interdigitale</u> , <u>S. aureus</u> , <u>Salmonella</u> , <u>Cholera esuis</u> , <u>E. coli</u>	<u>S. aureus</u> , <u>Salmonella</u> , <u>Cholera esuis</u> , <u>Trichophyton mentagrophytes</u>	<u>Salmonella</u> , <u>Cholera euis</u> , <u>S. aureus</u> , <u>P. aeruginosa</u> , <u>Mycobacterium tuberculosis</u>
TOXICIDAD	Dañino si se ingiere	Efectos adversos a la salud no son esperados bajo las diluciones manejadas	No es tóxico utilizado en dilución
REQUIERE ENJUAGUE	No requiere enjuague	No requiere enjuague	No requiere enjuague, color indicador integrado
CORROSIVIDAD	No corrosivo utilizando dilución	No corrosivo utilizando dilución	Producto corrosivo
PROPIEDADES BIOLÓGICAS	Producto biodegradable	Producto biodegradable	
DILUCIÓN	1:64	1:256	1:213

SANITIZANTE	4	5	6
NATURALEZA	Base clorada	Base sal cuaternaria de amonio	Base sal cuaternaria de amonio
ESPECTRO DE ACTIVIDAD	<u>S. aureus,</u> <u>P. aeruginosa,</u> <u>Salmonella,</u> <u>Cholera esuis</u>	<u>S. aureus,</u> <u>P. aeruginosa,</u> <u>Salmonella,</u> <u>Cholera esuis</u>	<u>S. aureus,</u> <u>P. aeruginosa,</u> <u>Salmonella,</u> <u>Cholera esuis</u>
TOXICIDAD	Efectos adversos a la salud no son esperados bajo las diluciones manejadas.	No se absorbe a través de a piel, siendo no tóxico al manejarse bajo las diluciones esperadas.	Efectos adversos a la salud no son esperados bajo las diluciones manejadas.
REQUIERE ENJUAGUE	No requiere enjuague	No requiere enjuague	No requiere enjuague
CORROSIVIDAD	No corrosivo utilizando dilución	No corrosivo utilizando dilución	Producto no corrosivo
PROPIEDADES BIOLÓGICAS	Producto biodegradable	Producto biodegradable	Producto biodegradable
DILUCIÓN	1:8	1:70	1:43

Tabla 2. Características y propiedades de diferentes agentes sanitizantes.

Sobre la base de las características encontradas para cada agente sanitizante se evaluaron los siguientes agentes sanitizantes denotándolos por las siguientes siglas (Sanitizante 1= Sanitizante A, Sanitizante 2= Sanitizante B, Sanitizante 4= Sanitizante C y Sanitizante 5= Sanitizante D).

## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y DEL TIEMPO MÍNIMO DE ACCIÓN.

### SANITIZANTE A

Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba. Diluciones elaboradas para obtener una suspensión que leída a una longitud de onda de 580 nm dé una lectura entre 3 a 5% de transmitancia.

1:1x10<sup>8</sup> para S. aureus

1:1x10<sup>8</sup> para E. coli

#### Método de prueba

Cuenta viable inicial

Microorganismo	UFC	UFC/ml
<u>E. coli</u>	130	130x10 <sup>8</sup>
<u>S. aureus</u>	84	84x10 <sup>8</sup>

Determinación de la actividad antimicrobiana.

S. aureus ATCC 6538 99.999% de reducción a los 30 segundos.

E. coli ATCC 11229 99.999% de reducción a los 30 segundos.

Determinación del tiempo mínimo de exposición del sanitizante A.

Tiempo (minutos)	% de reducción	
	<u>S. aureus</u>	<u>E. coli</u>
0.5	87.5000	58.8461
1	94.6428	71.1538
2	94.0476	78.0769
5	95.2380	92.3076
7	99.4000	91.5384
10	100.0000	94.6153
20	100.0000	97.6923

(Gráfico 1)

Tiempo mínimo encontrado 10 minutos, para el sanitizante A.

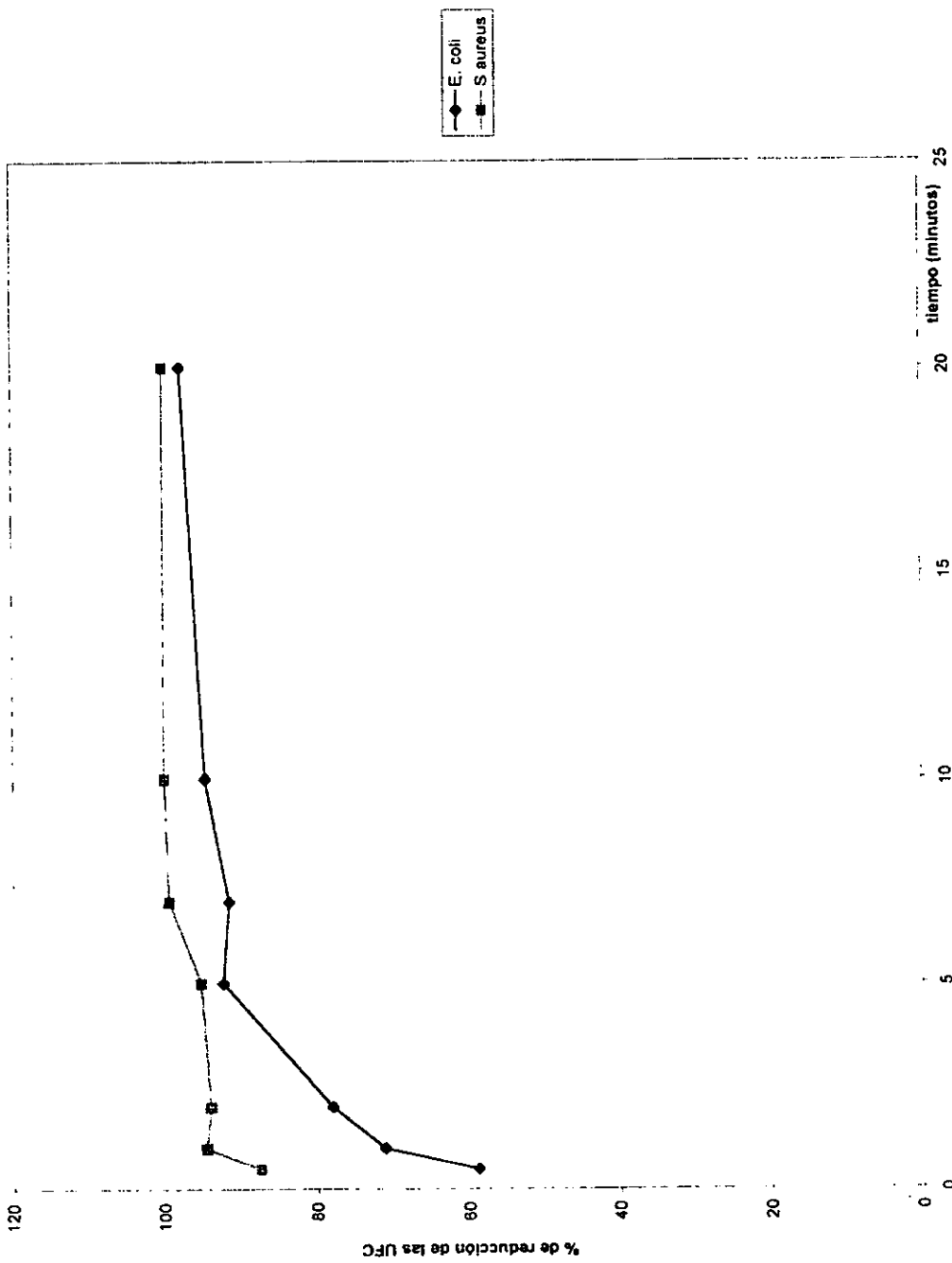


Grafico 1. Relación del sanitizante A con los microorganismos de prueba

## SANITIZANTE B

Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba. Diluciones elaboradas para obtener una suspensión que leída a una longitud de onda de 580 nm dé una lectura entre 3 a 5% de transmitancia.

1:1x10<sup>8</sup> para S. aureus

1:1x10<sup>8</sup> para E. coli

### Método de prueba

Cuenta viable inicial

Microorganismo	UFC	UFC/ml
<u>E. coli</u>	121	121x10 <sup>8</sup>
<u>S. aureus</u>	114	114x10 <sup>8</sup>

### Determinación de la actividad antimicrobiana.

S. aureus ATCC 6538 99.999% de reducción a los 30 segundos.

E. coli ATCC 11229 99.999% de reducción a los 30 segundos.

### Determinación del tiempo mínimo de exposición del sanitizante B.

Tiempo (minutos)	% de reducción	
	<u>S. aureus</u>	<u>E. coli</u>
0.5	97.8070	91.3223
1	98.6842	91.7355
2	99.1228	97.1074
5	99.5614	99.3801
7	100.0000	99.3801
10	100.0000	99.3801
20	100.0000	100.0000

(Gráfico 2)

Tiempo mínimo encontrado 7 minutos, para el sanitizante B.



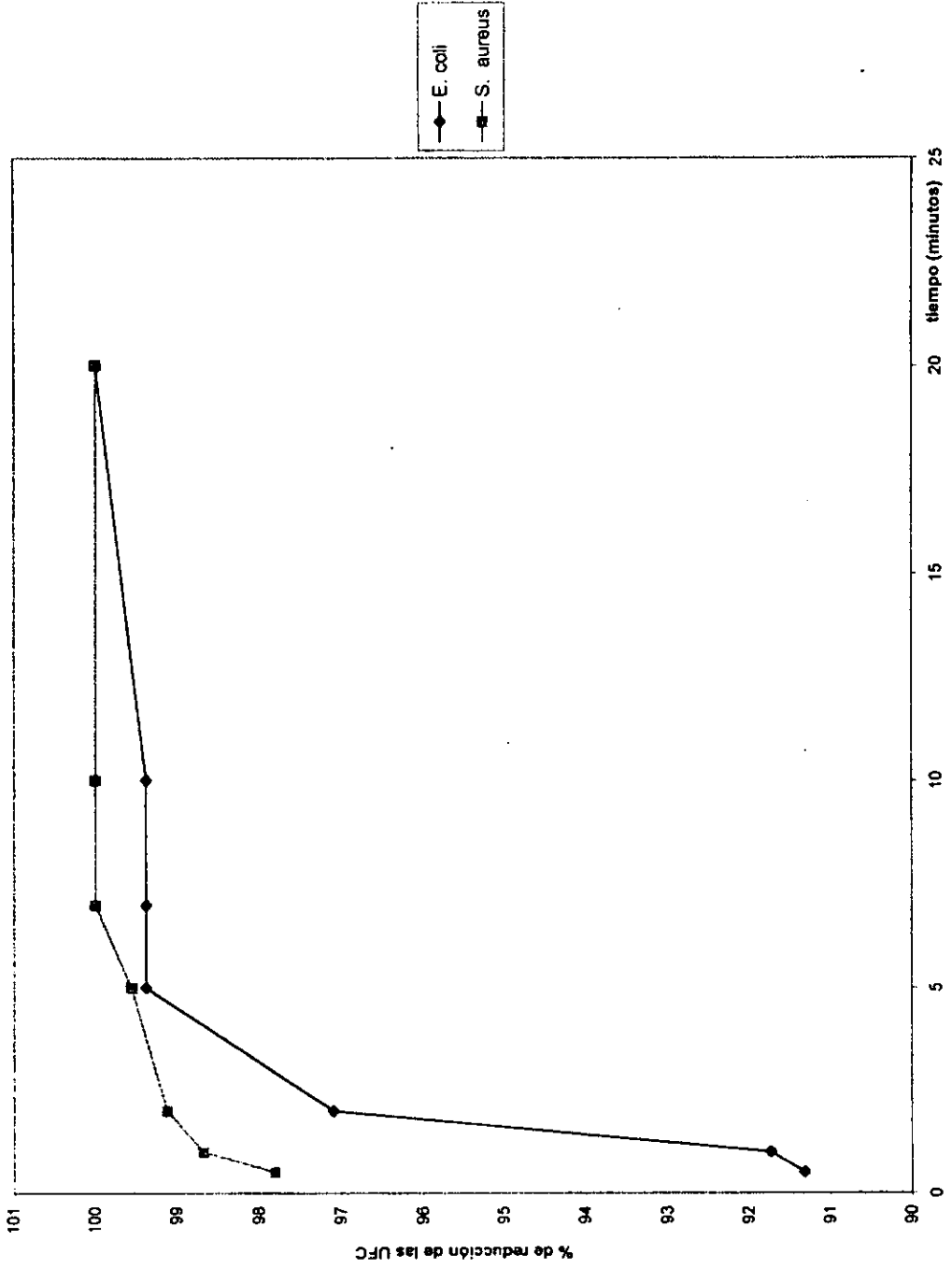


Gráfico 2. Relación del Sanitizante B con los microorganismos de prueba

## SANITIZANTE C

Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba. Diluciones elaboradas para obtener una suspensión que leída a una longitud de onda de 580 nm dé una lectura entre 3 a 5% de transmitancia.

1:1x10<sup>8</sup> para S. aureus

1:1x10<sup>8</sup> para E. coli

### Método de prueba

Cuenta viable inicial

Microorganismo	UFC	UFC/ml
<u>E. coli</u>	121	121x10 <sup>8</sup>
<u>S. aureus</u>	114	114x10 <sup>8</sup>

Determinación de la actividad antimicrobiana.

S. aureus ATCC 6538 99.999% de reducción a los 30 segundos.

E. coli ATCC 11229 99.999% de reducción a los 30 segundos.

Determinación del tiempo mínimo de exposición del sanitizante C.

Tiempo (minutos)	% de reducción	
	<u>S. aureus</u>	<u>E. coli</u>
0.5	95.1754	77.5626
1	96.9298	89.9772
2	98.2456	98.6332
5	98.2456	98.9749
7	99.5614	99.2000
10	100.0000	100.0000
20	100.0000	100.0000

(Gráfico 3)

Tiempo mínimo encontrado 10 minutos, para el sanitizante C.

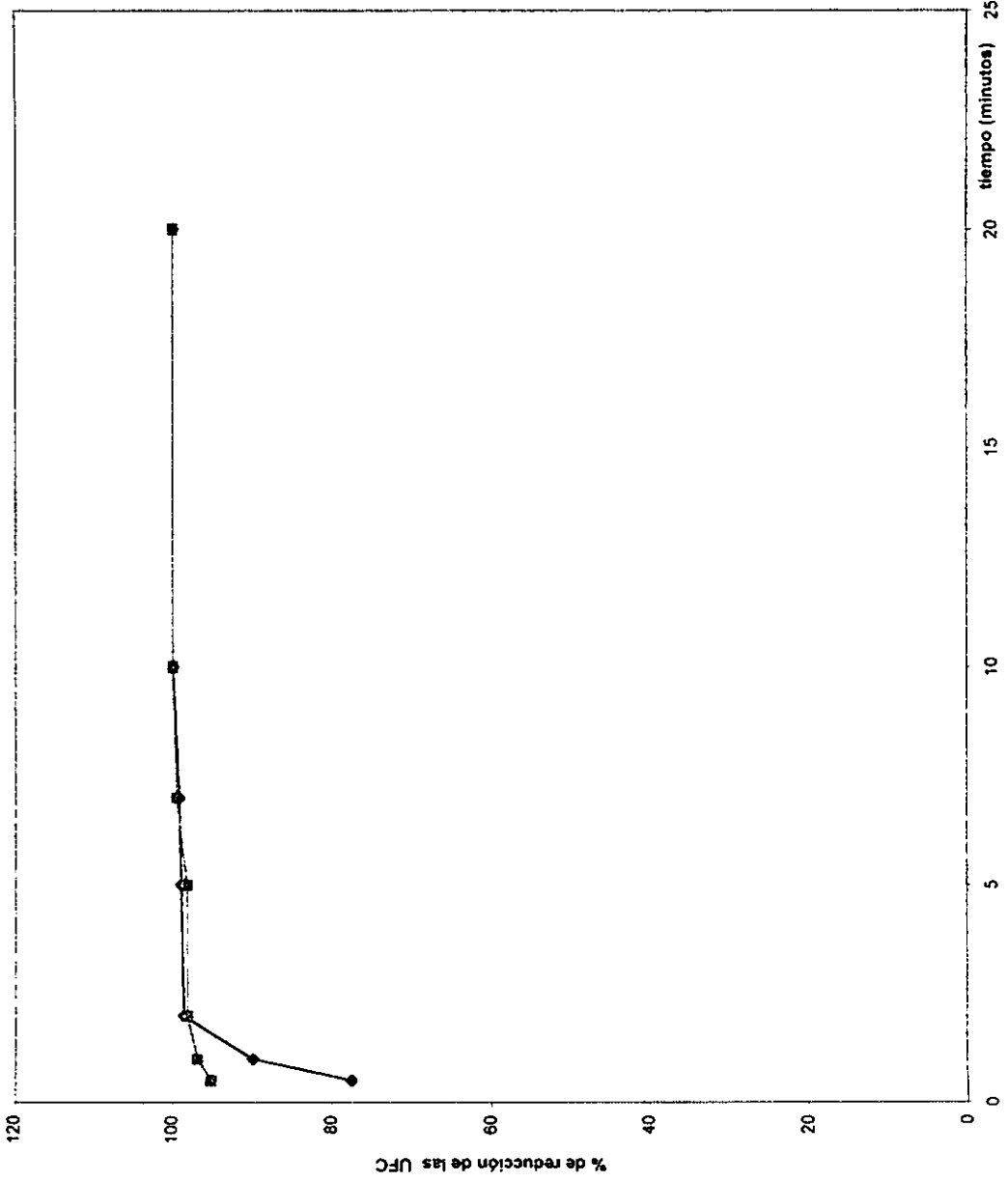


Grafico 3. Relación del Sanitizante C con los microorganismos de prueba

## SANITIZANTE D

Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba. Diluciones elaboradas para obtener una suspensión que leída a una longitud de onda de 580 nm dé una lectura entre 3 a 5% de transmitancia.

1:1x10<sup>8</sup> para S. aureus

1:1x10<sup>8</sup> para E. coli

### Método de prueba

Cuenta viable inicial

Microorganismo	UFC	UFC/ml
<u>E. coli</u>	130	130x10 <sup>8</sup>
<u>S. aureus</u>	84	84x10 <sup>8</sup>

Determinación de la actividad antimicrobiana.

S. aureus ATCC 6538 99.999% de reducción a los 30 segundos.

E. coli ATCC 11229 99.999% de reducción a los 30 segundos.

Determinación del tiempo mínimo de exposición del sanitizante D.

Tiempo (minutos)	% de reducción	
	<u>S. aureus</u>	<u>E. coli</u>
0.5	100.0000	98.0760
1	100.0000	98.8461
2	100.0000	100.0000
5	100.0000	100.0000
7	100.0000	100.0000
10	100.0000	100.0000
20	100.0000	100.0000

(Gráfico 4)

Tiempo mínimo encontrado 2 minutos, para el sanitizante D.

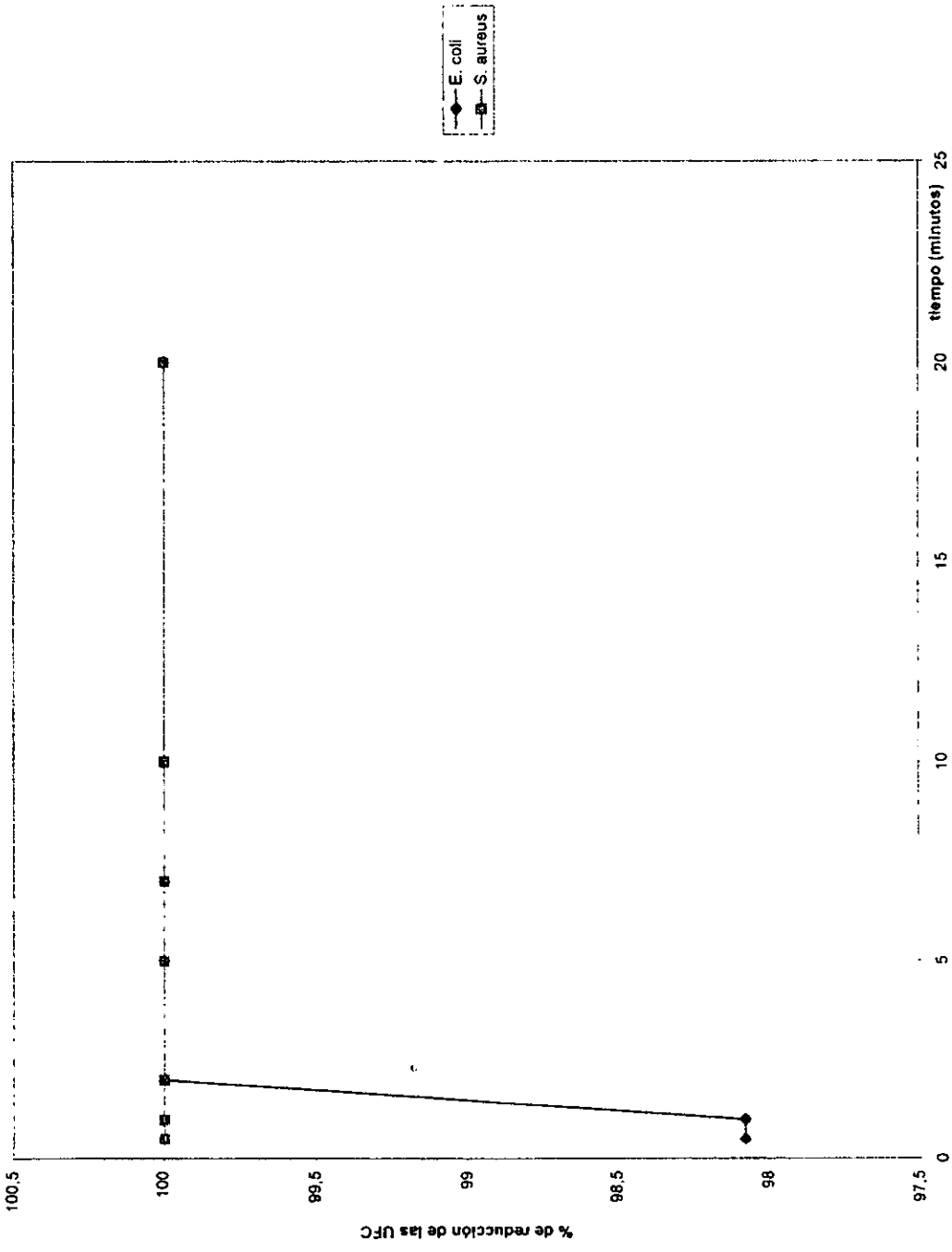


Gráfico 4. Relación del Sanitizante D con los microorganismos de prueba

## MONITOREOS AMBIENTALES

Al finalizar los monitoreos ambientales se promedio las UFC encontradas a tiempo cero y las UFC encontradas después de los procesos de sanitización manejándose para ello el tiempo mínimo encontrado para cada sanitizante, encontrándose los siguientes resultados:

Sanitizante A Porcentaje de reducción	Sanitizante B Porcentaje de reducción	Sanitizante C Porcentaje de reducción	Sanitizante D Porcentaje de reducción
93.7500	94.7368	74.5555	100.0000
95.0000	92.5926	74.2857	94.4444
100.0000	100.0000	94.4444	100.0000
100.0000	100.0000	100.0000	100.0000

Tabla 3. Porcentajes de reducción de las UFC encontradas en el área de llenado de polvos al finalizar el calendario de rotación de los cuatro agentes sanitizantes.

## DESARROLLO DEL MODELO ESTADISTICO

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{j(i)}$$

Donde:

$Y_{ij}$  Es la suma (ij)-ésima observación.

$\mu$  Es el parámetro común a todos los tratamientos denominado media global.

$\tau_i$  Es un parámetro único para el i-ésimo tratamiento llamado efecto del tratamiento iésimo.

$\varepsilon_{j(i)}$  Es la componente aleatoria del error.

$i=1, 2, \dots, t$

$j=1, 2, \dots, r$

Por lo tanto para nuestro proyecto tenemos:

$Y_{ij}$  Es la suma (ij)-ésima de los porcentajes de reducción obtenidos con los diferentes sanitizantes.

$\mu$  Es el parámetro común a todos los tratamientos.

$t_i$  Efecto del tipo de sanitizante.

$\varepsilon_{j(i)}$  Es la componente aleatoria del error.

El procedimiento de prueba se resume en la Tabla 4.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad (gl)	Media de cuadrados	Fo
Entre tratamientos	$SC_{\text{Tratamientos}}$	$t-1$	$SC_T / gl_T$	$MC_T / MC_E$
Error (Dentro de tratamientos)	$SC_E$	$t(r-1)$	$SC_E / gl_E$	
Total	$SC_{\text{Total}}$	$(tr-1)$		

Tabla 4. Tabla de análisis de varianza para el modelo de efectos fijos unifactorial

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

$H_i = \text{AL MENOS UNA DE ELLAS ES DIFERENTE}$

Por ciento de reducción de UFC con los diferentes sanitizantes					
Sanitizante A	Sanitizante B	Sanitizante C	Sanitizante D	Totales $Y_i$	Promedio $Y_i$
93.7500	94.7368	74.5555	100.0000	363.0423	90.7605
95.0000	92.5926	74.2857	94.4444	356.3227	89.0806
100.0000	100.0000	94.4444	100.0000	394.4444	98.6111
100.0000	100.0000	100.0000	100.0000	400.0000	100.0000
				Y..1513.8094	Y..94.6130

Tabla 5. Recopilación de datos para el desarrollo del modelo estadístico.

Donde:

$r=4$  (4 repeticiones)

$t=4$  (4 niveles del factor Y)

Las sumas de cuadrados requeridas para el análisis de varianza se calcula como sigue:

$$SC_{\text{TRATAMIENTOS}} = \sum_i^4 = \frac{Y_{i.}^2}{r} - \frac{Y_{..}^2}{tr}$$

$$= \frac{(363.0423^2 + 356.3227^2 + 394.4444^2 + 400.0000^2)}{4} - \frac{1513.8094^2}{16}$$

$$= \underline{361.8095}$$

$$SC_{\text{TOTAL}} = \sum_{i=1}^4 \sum_{j=1}^4 = Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{tr}$$

$$= (93.7500^2 + 95.0000^2 + 100.0000^2 + 100.0000^2 + 94.7368^2 + 92.5926^2 + 100.0000^2 + 100.0000^2 + 74.5555^2 + 74.2857^2 + 94.4444^2 + 100.0000^2 + 100.0000^2 + 94.4444^2 + 100.0000^2 + 100.0000^2) - \frac{1513.8094^2}{16}$$

$$= \underline{1052.7093}$$

$$SC_{\text{ERROR}} = SC_{\text{TOTAL}} - SC_{\text{TRATAMIENTOS}}$$

$$= 1052.7093 - 361.8095$$

$$= \underline{690.8998}$$



El procedimiento de prueba con los resultados finales se resumen en la tabla 6.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad (gl)	Media de cuadrados	Fo
Entre tratamientos	361.8095	3	120.6031	2.0947
Error (Dentro de tratamientos)	690.8998	12	57.5749	
Total	1052.7093	15		

Tabla 6. Resultados del análisis de varianza para el modelo de efectos fijos unifactorial.

Con referencia al anexo 2 de distribución F con  $v_1 = 3$  y  $v_2 = 12$  a  $F_{0.95}$  se encuentra el valor de 3.49.

**Criterio de aceptación**

Si  $F_o < F_{.95(3, 12)}$ , Se acepta  $H_o$ .

**Resultado**

$2.0947 < 3.49$  por tanto,  $H_o$  se acepta. Por lo que se dice que no hay diferencia significativa entre los tratamientos manejados con los agentes sanitizantes utilizados.

## 7.0 DISCUSION DE RESULTADOS

En relación a la selección de agentes sanitizantes se observó que el método de elección esta basado en las características particulares de cada sanitizante, encontrándose estas características en las hojas de seguridad de cada sanitizante que los proveedores ofrecen junto con sus productos.

Se seleccionaron los sanitizantes 1, 2, 4 y 5 debido a que su espectro de actividad es alto, además de que no presentan problemas de toxicidad, no son corrosivos y son productos biodegradables además de que en el caso de los sanitizantes 1, 2 y 4 se tiene un factor de dilución alto.

El sanitizante 3 con base yodada fue descartado por ser un producto corrosivo, además de que presentaba color que dañaba las paredes del área en estudio, no importando en este caso la dilución. El sanitizante 6 con base sal cuaternaria de amonio tiene las mismas propiedades que el sanitizante 4, pero debido a su factor de dilución no es seleccionado, ya que con el sanitizante 4 se obtiene un volumen mayor de producto que con el sanitizante 6.

Los sanitizantes seleccionados permitieron formar un calendario de rotación, alternando para ello la naturaleza de estos, por lo que se propuso un calendario de agentes sanitizantes con base fenólica, base sal cuaternaria de amonio, base clorada y base sal cuaternaria de amonio, ofreciendo con esto que los microorganismos presentes en el área de trabajo no generen resistencia a los agentes sanitizantes.

En base a la determinación de la actividad antimicrobiana de los cuatro agentes sanitizantes, se observó que los sanitizantes cumplen satisfactoriamente con los límites establecidos para cualquier sanitizante (99.999% de reducción de la viabilidad de los microorganismos de prueba a los 30 segundos de contacto).

En relación a los resultados obtenidos en la determinación del tiempo mínimo de acción se encontró que el sanitizante A tiene mayor actividad antimicrobiana contra el microorganismo de

prueba S. aureus, mismo fenómeno que se observa con los otros sanitizantes no importando para ello la base de los sanitizantes, esto se puede deber a la distinta composición que presentan los microorganismos a nivel de pared celular.

Se observó que los sanitizantes B y D con base sal cuaternaria de amonio, tienen un tiempo mínimo más pequeño en relación a los otros agentes sanitizantes, esto nos indica que este sanitizante actúa más rápidamente que los otros, teniendo por ello un efecto letal más rápido, dentro de los mismos agentes B y D se observa que el agente B tiene un tiempo mínimo de 7 minutos y el agente D un tiempo de 2 minutos, esto posiblemente se deba a que a pesar de tener la misma base y tener un espectro de actividad muy parecido difieren en el factor de dilución, siendo más alto este factor en el sanitizante con mayor tiempo. Además se observó que con el sanitizante D, los resultados que se presentaron en relación al porcentaje de eliminación son más consistentes que con los otros sanitizantes.

Por los resultados obtenidos durante los monitoreos se observó que conforme iba avanzando el calendario de rotación de los agentes sanitizantes iba reduciéndose la cantidad de contaminantes microbianos que se encontraban presentes, esto se puede deber a que no se les permitía a los microorganismos generar resistencia, debido a que las bases que tenían los agentes sanitizantes eran distintas.

Con relación al modelo estadístico que se desarrolló se encontró que se acepta la hipótesis nula con una  $F_{0.95(3,12)}$  por lo que podemos decir que las medias de los tratamientos no difieren unas de otras, además de que no existe una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos con los agentes sanitizantes manejados durante el calendario de rotación, además de que nos indica que las diferencias en porcentaje que existen en los porcentajes de reducción de las UFC se deben completamente a errores aleatorios del método.

## 8.0 CONCLUSIONES.

1. Los agentes sanitizantes varían ampliamente unos de otros en su naturaleza, su actividad y su dilución, así como en sus propiedades biológicas por lo tanto el conocimiento completo de sus atributos ayuda a elegir el agente sanitizante adecuado que cubra todas las necesidades del laboratorio.
2. Los agentes sanitizantes evaluados cumplen con los límites establecidos según el método del IMSS para la Determinación de la Actividad Antimicrobiana, teniendo un 99.999% de reducción de la viabilidad de los microorganismos de prueba, a los 30 segundos de contacto.
3. En relación a la reducción de los microorganismos de prueba (*S. aureus* y *E. coli*), se concluye que los cuatro agentes sanitizantes evaluados presentan mayor actividad antimicrobiana con el microorganismos *S. aureus*.
4. Los agentes sanitizantes con base sal cuaternaria de amonio, tienen un tiempo mínimo de acción más pequeño que los agentes con base clorado y fenólica.
5. Se encontró en este estudio que el calendario de rotación de agentes sanitizantes, redujo conforme al tiempo, la población de UFC encontradas en el área de llenado de polvos.
6. Al aplicar el modelo estadístico planteado se observó que no hay diferencia significativa entre los agentes sanitizantes, manejados a lo largo de este estudio, por lo cual se considera que el programa de rotación de agentes sanitizantes utilizado en el área de llenado de polvos es la adecuada.

## **9.0 RECOMENDACIONES.**

**Se recomienda el seguimiento de este estudio para proceder a validar los procedimientos de limpieza y sanitización.**

## 10.0 ANEXOS.

### Anexo 1

### PROCEDIMIENTO: LIMPIEZA Y SANITIZACION DEL AREA DE LLENADO DE POLVOS

#### OBJETIVO

Implementar un programa de limpieza y sanitización eficiente que cubra todas las necesidades del laboratorio Atlantis S. A. de C. V., planta beta-lactamicos.

#### ALCANCE

Todos los departamentos y áreas de producción que requieran programas de limpieza y sanitización.

#### POLITICAS

El presente procedimiento estándar de operación es responsabilidad de todos los involucrados en la producción de un producto farmacéutico.

#### DEFINICIONES

*Limpieza* : Removimiento de contaminantes no deseados. En la manufactura farmacéutica los residuos no deseados son típicamente los restos de los productos manufacturados anteriormente, pero también se incluyen partículas y endotoxinas.

*Sanitización* : Es un proceso que se encuentra relacionado con el uso de agentes que eliminan la contaminación microbiana. La sanitización forma parte de los procesos de limpieza.

*Detergente* : Los detergentes son mezclas de tensoactivos, secuestrantes, conservadores y agentes amortiguadores, que tienen la particularidad de limpiar un objeto sin causar abrasión ni corrosión.

*Sanitizante* : Es 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.

*Contaminación* : La contaminación de productos farmacéuticos es definida como la presencia de entidades físicas, químicas o biológicas indeseables en un producto.

*Rotación de agentes sanitizantes* : Es el uso alternado de agentes sanitizantes los cuales tienen diferentes bases para

prevenir con ello la aparición de resistencia por parte de los microorganismos.

## **SEGURIDAD**

Almacene los detergentes y sanitizantes en lugares fríos y secos. Usar guantes, lentes de seguridad y cubrebocas durante los procesos de limpieza y sanitización.

Evítese el contacto de los detergentes y sanitizantes con la piel en caso de presentarse lave con agua y jabón.

Si se presenta contacto de los detergentes y sanitizantes con los ojos, lávese inmediatamente con agua y consulte al médico.

Si se presenta irritación con el uso de los detergentes y sanitizantes consulte al médico.

Proteger las fuentes de corriente eléctrica antes de los procesos de limpieza y sanitización.

## **EQUIPO Y/O MATERIAL REQUERIDO**

Agua desionizada, solución detergente y solución sanitizante.

Materiales auxiliares: El usual para los procesos de limpieza y sanitización (cepillo de cerdas finas, jalador de agua, franelas, espontex o jergas, cubeta de plástico, frascos atomizadores)

## **PROCEDIMIENTO**

1. Fase de prelavado. El área a limpiar y sanitizar deberá ser sometida a un prelavado con agua caliente a 65°C aproximadamente.

2. Fase de lavado. Esto consiste de un lavado con una solución detergente (Dextran o en su ausencia 13 g de jabón kelvar en 10 litros de agua desionizada y mezclar), misma solución que deberá aplicarse de la siguiente manera:

Humedezca la jerga con la solución detergente y proceda a limpiar en el siguiente orden, techo, Paredes y piso, de adentro hacia afuera.

Elimine el detergente en el mismo orden y de adentro hacia afuera, con ayuda de otra jerga limpia y humedecida con agua.

3. Fase de preenjuague. Esta consiste de un enjuague con agua caliente con el fin de eliminar la solución detergente.

4. Fase de sanitización. Con ayuda de un atomizador rocíe la solución sanitizante aplicando en techos paredes y piso de

adentro hacia la puerta. Deje actuar el sanitizante según el tiempo óptimo de cada sanitizante.

5. Fase de enjuague final. Esta fase depende del sanitizante que a sido utilizado, ya que existen sanitizantes que no requieren enjuague final. En dado caso que el sanitizante si requiera enjuague final se utilizara agua caliente como en los anteriores enjuagues.

6. Fase de secado. Esto consiste en dejar secar el área ya sea por aire o utilizando vacío.

Todas las fases descritas tienen la intención de obtener un lavado y sanitización eficiente.

### COMENTARIOS

- a) El detergente a utilizar no debe causar abrasión ni corrosión.
- b) El sanitizante a utilizar debe ser el adecuado utilizando como base el programa de sanitización que se lleve a cabo en el laboratorio.
- c) El sanitizante a utilizar debe especificar la dilución a emplear, si requiere o no requiere enjuague final, la base que presenta y el tiempo óptimo de acción.
- d) El presente procedimiento anexa el programa de sanitización con la información que debe presentar cada sanitizante.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. LeBlanc D and et al. "Cleaning Technology Pharmaceutical Manufacturing" Pharmaceutical Technology; 17(7), 84-92 (1993)
2. Carleton F, Agalloco J. Validation of aseptic pharmaceutical processes. New York: editorial Marcel Dekker, 387-407 (1986)
3. Putteman P. "Clean-in-place systems for non-sterile liquids and semisolids cleaning cycle development-cleaning validation", Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas ; 20(6), 26-31 (1990).



## PROGRAMA DE SANITIZACIÓN

## S E M A N A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
SANITIZANTE A	X				X				X				X			
SANITIZANTE B		X				X				X				X		
SANITIZANTE C			X				X				X				X	
SANITIZANTE D				X				X				X				X

Tabla 1. Calendario de rotación de agentes sanitizantes.

**SANITIZANTE A:**  
**NO REQUIERE ENJUAGUE**  
**BASE: FENÓLICA**  
**DILUCIÓN 1:64**  
**TIEMPO MÍNIMO: 10 MINUTOS.**

**SANITIZANTE B:**  
**NO REQUIERE ENJUAGUE**  
**BASE: CUATERNARIA DE AMONIO**  
**DILUCIÓN 1:256**  
**TIEMPO MÍNIMO: 7 MINUTOS.**

**SANITIZANTE C:**  
**NO REQUIERE ENJUAGUE**  
**BASE: CLORADA**  
**DILUCION: 1:8**  
**TIEMPO MÍNIMO: 10 MINUTOS.**

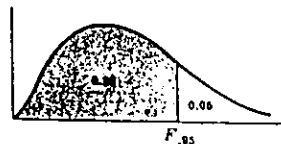
**SANITIZANTE D:**  
**NO REQUIERE ENJUAGUE**  
**BASE: CUATERNARIA DE AMONIO**  
**DILUCIÓN 1:70**  
**TIEMPO MÍNIMO: 2 MINUTOS**

## Anexo 2

Percentila 95 (niveles 0.05),  $F_{.95}$ ,  
para la  
distribución  $F$

$\nu_1$  grados de libertad en el numerador

$\nu_2$  grados de libertad en el denominador



$\nu_1 \backslash \nu_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	$\infty$
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	244	246	248	249	250	251	252	253	254
2	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
3	10.1	9.56	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.37
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.02	2.95	2.91	2.87	2.83	2.79	2.75	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.86	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79	1.73
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75	1.69
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73	1.67
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71	1.65
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70	1.64
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35	1.25
$\infty$	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00

**11.0 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.**

- 1. Martínez M. Procesos de sanitización y su validación. México: Instituto Mexicano de Capacitación de la Industria Farmacéutica, 1997: 3, 5, 8-15.**
- 2. Comisión Interinstitucional de Practicas Adecuadas de Manufactura. Guía de prácticas adecuadas de Manufactura Farmacéutica. 3a ed. México: CIPAM, 1989: 21-33**
- 3. Comisión Interinstitucional de Practicas Adecuadas de Manufactura. Guía de prácticas adecuadas de manufactura para cuartos limpios. Monografía técnica No 1. México: CIPAM, 1989: 2-5, 7-11.**
- 4. Codex Federal Regulations 211 Sección B, C, J Y M. Current good manufacturing practice. Amendment of certain requiriment Mayo 3 1996**
- 5. PhRMA Environmental monitoring Work Group. Microbiological monitoring of environmental conditions for nonsterile pharmaceutical, manufacturing. Pharmaceutical Technology 1997; 21 (3), 58-74**
- 6. Camacho P. Conceptos fundamentales de purificación de agua, en la industria farmacéutica. México: Instituto Mexicano de Capacitación de la Industria Farmacéutica, 1997: 70-71**
- 7. Couriel B. Validación de procesos farmacéuticos. Asociación Farmacéutica Mexicana. México: CMDIF, 1982: 61-62.**
- 8. U. S. Filter de México. Métodos de obtención de agua purificada para la industria farmacéutica (USP 23). Pharma News 1997; 8 (6), 39-32**
- 9. VECO. Control de la contaminación ambiental en la industria farmacéutica. Primera parte. Pharma News 1991; 2(6), 31-32**

10. Comisión Interinstitucional de Practicas Adecuadas de Manufactura. Guía para el control microbiológico de medicamentos. Monografía técnica No 4 México: CIPAM, 1992: 25-30
11. VECO. Control de la contaminación ambiental en la industria farmacéutica. Conclusiones. Pharma News 1991; 2(7), 45-47
12. Hertroys R, Van Vught P, Van De Donk H. Moving towards a (microbiological) environmental monitoring program that can be used to release aseptically produced pharmaceuticals: A hypothesis, a practical programme, and some results. PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 1997; 51 (1), 52-59.
13. McGoldrick K, Fox T, McAllister. Dry medium for detecting contamination on surfaces. Food Technology 1986; 40(4), 77-80.
14. PDA Environmental task force. Fundamentals of a microbiological environmental monitoring program. Journal Parenteral Science and Technology 1990; 44(Supplement S1) S3-S16
15. CESSA. Santec. Manual de uso de productos. México: Editorial Promase, 1997: 3-4
16. Norma IMSS. Métodos generales de análisis Determinación de la actividad antimicrobiana. México 1997: 1-10
17. Jawetz E. Microbiología medica. 12a ed. México: Editorial El Manual Moderno, 1987: 71-80
18. Groves M, Olson W, Anisfeld M. Sterile pharmaceutical manufacturing. Applications for the 1990's Vol 1 Buffalo Grove: Editorial Interpharm Press, 1991: 148-150
19. Carleton F, Agalloco J. Validation of aseptic pharmaceutical processes. New York: Editorial Marcel Dekker, 1986: 387-405

20. Lawrence C. Definition of terms in Disinfection, Sterilization and Preservation. S. S. Blook. 2a ed. Philadelphia: ED Lea & Febiger, 1971: pp 9-12
21. Codex Federal Regulations 21 Sec. 178.1010. Sanitizing solutions Versión 1.1. Marzo 1997
22. Sheldrake R, Hoare R, Hutchinson A. Post-milking skin disinfectants. Journal of Dairy Research 1980; 47(1), 19-26
23. Biocleaner de México. Situación actual de productos químicos para la desinfección, sanitización, limpieza y mantenimiento. Pharma News 1996; 7(11), 46-49
24. Giese J. Sanitation: The key to food safety and public health. Food Technology 1991; 45 (12), 74-80
25. Forwalter J. Selection Guide Cleaning and sanitizing compounds. Food Processing 1980; 41(2), 40-46
26. Dychdala g. Chlorine and chlorine compounds in Disinfection, Sterilization and Preservation. S. S. Blook. 2a ed. Philadelphia: ED Lea & Febiger, 1971: pp 278-291
27. McCarthy S. Attachment of *Listeria monocytogenes* to chitin and resistance to biocides. Food Technology 1992; 46(12), 84-87
28. Gershenfeld L. Iodine in Disinfection, Sterilization and Preservation. S. S. Blook. 2a ed. Philadelphia: ED Lea & Febiger, 1971: pp 329-337
29. Lawrence C. Quaternary ammonium surface-active disinfectants in Disinfection, Sterilization and Preservation. S. S. Blook. 2a ed. Philadelphia: ED Lea & Febiger, 1971: pp 430-433
30. Conner D, Eckman M. Rotation of phenolic disinfectants enhances efficacy against adherent *Pseudomonas aeruginosa* . Pharmaceutical Technology 1993; 17(10), 94-104

31. Conner D, Eckman M. Rotation of phenolic disinfectants. Pharmaceutical Technology 1992; 16(9), 148-160
32. Commager H, Judis J. Mechanism of action of phenolic disinfectants. Journal of Pharmaceutical Sciences 1965; 54(10), 1436-1439
33. Russell A, Hugo W. Principles practice of disinfecting, preservation sterilization. Boston: Ed Black Well Scientific Publications, 1982: PP 107- 112
34. Burdon K, Williams R. Microbiología. México: Editorial Publicaciones Culturales, 1986: 309-327
35. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 6a ed. México 1992: 150-154.
36. Kavanagh F. Analytical microbiology. New York: Editorial Acedic Press, 1972: 14-18
37. LeBlanc D. Cleaning technology for pharmaceutical manufacturing Pharmaceutical Technology 1993; 17(7), 84-92
38. Putteman P. Clean-in-place systems for non-sterile liquids and semi-solids cleaning cycle development-cleaning validation Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas 1990; 20(6), 26-31