



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**



**Evaluación de la actividad antimicrobiana de tres sanitizantes  
usados en los laboratorios de Microbiología General II y Laboratorio  
I planta alta de la UMIEZ de la FES Zaragoza.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

**Barrientos Hernández Fernando**

Director de tesis: Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara

Asesor de tesis: Dr. Rubén Marroquín Segura

México, D.F. 2013

**Un viaje de mil millas comienza con el primer paso.**  
**(LAO TSE) ■**

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, que gracias a su apoyo me ayudo a lograrlo, a mi madre María Teresa que siempre está conmigo enseñándome a seguir adelante y a ser una mejor persona en todos los sentidos. A mi padre que con su esfuerzo y confianza ha logrado día a día sacarme adelante, dándome la oportunidad de alcanzar esta meta.

A mis hermanos, Jeanette y Daniel por apoyarme siempre y ser mis pilares que me mantenían a seguir adelante.

A mis amigos, grandes compañeros a lo largo del camino, pasamos grandes momentos dentro y fuera de la Universidad con esas experiencias invaluable que se quedan en mí, para toda la vida.

## AGRADECIMIENTOS

A los Doctores José Luis Alfredo Mora Guevara y Rubén Marroquín Segura, a la Mtra. Yolanda Flores Cabrera, gracias por el apoyo que me brindaron para realizar este proyecto así como los buenos momentos en el laboratorio.

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

Gracias a todos porque de una u otra forma construyeron conmigo este trabajo, ayudándome a concluir una de mis metas más importantes.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
1. MARCO TEÓRICO	
1.1. Limpieza .....	9
1.1.1.Realización .....	9
1.1.2.Verificación de la eficacia de los procedimientos.....	10
1.2. Sanitización .....	10
1.2.1.Consideraciones para la selección .....	11
1.2.2.Clasificación .....	12
1.2.3.Rotación .....	19
1.2.4.Niveles de desinfección .....	19
1.2.5.Factores que influyen en la eficacia del desinfectante.....	20
1.2.6.Técnicas para la evaluación de la eficacia del desinfectante.....	21
1.2.7.Microorganismos utilizados para la evaluación.....	23
1.2.8.Ensayos en superficies .....	24
1.3. NMX-BB-040-SCFI-1999	
1.3.1.Objetivo.....	24
1.3.2.Campo de aplicación.....	24
1.3.3.Fundamento.....	24
1.4. Microorganismos de prueba.....	25
1.4.1. <i>Escherichia coli</i> .....	25
1.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
1.5. Microorganismos comunes en superficies .....	27
1.6. Sanitizantes utilizados .....	28
1.6.1.Etanol .....	29
1.6.2.Hipoclorito de sodio.....	30
1.6.3.Cloruro de benzalconio .....	32
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	34
3. OBJETIVOS .....	35
4. HIPÓTESIS .....	35
5. TIPO DE ESTUDIO.....	36

6. DISEÑO METODOLÓGICO	
6.1. Material y Equipo.....	37
6.2. Reactivos.....	37
6.3. Metodología	
6.3.1.Diagrama de flujo.....	38
6.3.2.Desinfectantes a usar.....	38
6.3.3.Preparación y acondicionamiento de la muestra .....	39
6.3.4.Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba .....	39
6.3.5.Determinación de la cuenta viable inicial.....	39
6.3.6.Determinación de las células sobrevivientes.....	40
6.3.7.Ensayo en superficie .....	41
6.3.7.1.. Determinación de células sobrevivientes en superficie .....	41
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
7.1. Determinación de células sobrevivientes NMX-BB-040-SCFI-1999.....	43
7.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	43
7.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	45
7.1.3.Dictamen de la norma.....	47
7.2. Ensayo en superficie .....	48
7.2.1.Evaluación de resultados .....	50
8. CONCLUSIONES.....	52
9. SUGERENCIAS .....	53
10. REFERENCIAS .....	54
GLOSARIO.....	57
ANEXOS .....	58

## RESUMEN

La limpieza es un tema importante en el ámbito industrial en diferentes áreas ya que afecta notablemente la calidad de los productos que se generan, debido a que los microorganismos (m.o.) están presentes en las superficies son los reservorios más importantes como fuente de contaminación, es por ello necesario que además de realizar la limpieza también se efectuó la desinfección, procesos que si bien son complementarios no son iguales. En la industria farmacéutica estas fuentes de contaminación se controlan por medio de agentes químicos que destruyan esta biocarga de manera eficaz, que aplicados en adecuados programas de sanitización, ayudan a prevenir y reducir la contaminación microbiológica presente en las áreas de trabajo. Esto llevado al ámbito educativo en la carrera de Química Farmacéutico Biológica (QFB) donde se tienen laboratorios experimentales de Microbiología y de Investigación en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) para la práctica de los estudiantes es importante el control de dichos microorganismos, sin embargo en muchos casos no se ha realizado una evaluación experimental adecuada del efecto esperado de los sanitizantes utilizados.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de tres sanitizantes utilizados en los laboratorios de Microbiología General II y Laboratorio I de la UMIEZ de acuerdo a la norma NMX-BB-040-SCFI-1999 de métodos generales de análisis - determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas, donde se encontró que dos sanitizantes, el hipoclorito de sodio a 1000 ppm y cloruro de benzalconio al 1% cumplen satisfactoriamente al eliminar las cepas de *Escherichia coli* ATCC 11229 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 en un 99.999%, no así el etanol al 70% donde se encontró sólo una eliminación del 98.95%. Con un ensayo en superficies se corroboró la eficacia de dichos sanitizantes por medio del recuento de colonias después de la sanitización, encontrándose que el mejor es el hipoclorito de sodio por su alta eficacia al tener el menor recuento de colonias así como por su bajo costo, además se obtuvo que este tiene mejor efecto alrededor de los diez minutos de haber sido aplicado.

## INTRODUCCIÓN

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

En la industria farmacéutica se utilizan desinfectantes para eliminar la carga microbiana, por lo tanto la desinfección es un proceso crítico en las áreas de producción donde se demanda la utilización de un control minucioso y regulación de todas las posibles áreas de contaminación: superficies planas, ductos, estanques de mezclado y almacenamiento deben ser por tanto rigurosamente controladas. De igual manera, es importante llevar cabo la sanitización en los laboratorios, para que se garantice que la contaminación que se encuentra en las superficies no interfiera con los ensayos realizados, y dado que en la FES Zaragoza se imparte la carrera de QFB y se tienen los laboratorios experimentales de Microbiología General (MG) y de Investigación en la UMIEZ para las prácticas y proyectos de los estudiantes, es necesario un manejo adecuado de la limpieza y sanitización en las áreas de trabajo. Es por ello que al evaluarse la actividad antimicrobiana de los sanitizantes usados en los laboratorios, se busca demostrar experimentalmente que cumplen con su función, eliminando a los microorganismos.



## **1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1. Limpieza**

A menudo se ha considerado que a la limpieza y a la desinfección como conceptos sinónimos, pero en realidad son operaciones complementarias pero diferentes. La limpieza es el proceso mediante el cual se logra la eliminación de la suciedad en las superficies aplicadas, que significa a la vez la eliminación de la fracción principal de gérmenes presentes en las superficies.<sup>1</sup>

Por otro lado la desinfección es la eliminación de microorganismos infecciosos en objetos inanimados o la reducción de los mismos a niveles que no constituyan un peligro para la salud pública por medio de un desinfectante, el cual es un agente químico que destruye o elimina microorganismos en superficies inanimadas. En el proceso de desinfección se produce una reacción entre el agente infeccioso y el desinfectante mediante el cual se destruye o reduce al agente infeccioso, pudiendo ser empleados para tal fin medios químicos que se detallaran más adelante.

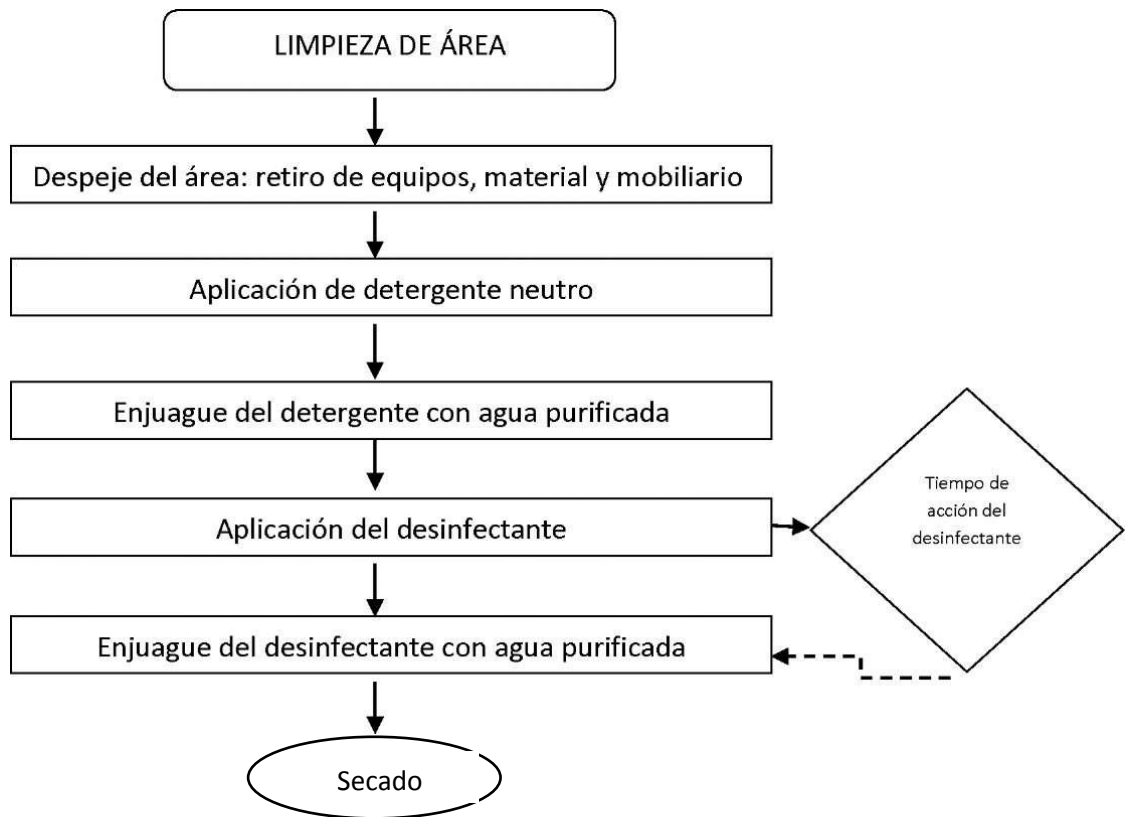
#### **1.1.1. Realización**

Se recomienda que la limpieza se realice<sup>2</sup>:

- a) En forma progresiva y ordenada; de las áreas lo más limpias a las menos limpias.
- b) Realizar la operación en trazos paralelos con pequeño ángulo de inclinación que evite la recontaminación de áreas limpias.
- c) El paño para limpiar debe estar doblado para producir una presión más uniforme de mano y dedos.
- d) Así mismo el paño tendrá la superficie suficiente para asegurar que toda el área sea limpiada.
- e) Cambiar la superficie del paño limpiador al inicio de cada trazo o línea.

La limpieza de un área o cuarto se realiza en el siguiente orden:

**Diagrama 1.** Pasos a seguir para la limpieza y desinfección de un área<sup>3</sup>



### 1.1.2. Verificación de la eficacia de los procedimientos

Deberá verificarse la eficacia de los procedimientos de limpieza y desinfección mediante la vigilancia microbiológica de las superficies que entran en contacto con los productos.

En el muestreo para la verificación microbiológica del equipo y las superficies que entran en contacto con los productos, deberá utilizarse un agente atenuador (neutralizador) para eliminar cualquier residuo de desinfectantes.<sup>4</sup>

## 1.2. Sanitización

Se le llama sanitización a la acción de eliminar o reducir los niveles de partículas viables por medio de agentes químicos posteriores a la actividad de limpieza<sup>5</sup>, un sanitizante es un agente químico que reduce o elimina, bacterias, hongos y algunos virus

en superficies inanimadas.<sup>6</sup> Un buen desinfectante según el test de Chambers es aquel que, a la concentración recomendada, causa un 99.9996% de muerte a una cantidad inicial entre  $7.5 \times 10^7$  y  $1.3 \times 10^8$  células/ml en 30 segundos.<sup>7</sup>

El sanitizante ideal<sup>8</sup>:

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

### 1.2.1. Consideraciones para la selección de un sanitizante.

Hay por lo menos 9 puntos a considerar en la selección de un desinfectante<sup>9</sup>.

- **Biocarga.** El número de microorganismos presentes en las áreas que necesitan ser sometidos a una desinfección es importante así como el tipo de microorganismos presentes.
- **Superficie.** El tipo de superficie puede reaccionar con los productos químicos que han de aplicarse. Por lo tanto la compatibilidad de la superficie con cada desinfectante debe ser evaluado.
- **Resultado final.** Analizar si se requiere reducir la carga bacteriana a un nivel seguro o por el contrario, eliminar completamente la biocarga.
- **Tiempo de contacto.** Los desinfectantes requieren una cierta cantidad de tiempo para hacer su trabajo mientras mayor carga este presente mayor tiempo deberá estar en contacto con el desinfectante.

- **Materia Orgánica.** La presencia de materia orgánica tendrá un impacto negativo en el desempeño de algunos desinfectantes. Se sabe que el alcohol se ve afectado por la presencia de suelo, lo que requiere más tiempo de contacto cuando esto ocurre.
- **Pasos de la preparación.** La exactitud de la dilución en la preparación del desinfectante es crucial para el resultado final deseado, ya que ciertos desinfectantes trabajan mejor a una concentración específica.
- **Periodo de validez.** La fecha de caducidad determina el periodo de validez para el desinfectante, esta fecha está determinada por el fabricante basado en estudios de estabilidad, los cuales también determinan si el compuesto es sensible a la luz, lo cual requiere un almacenamiento en un recipiente de color ámbar o equivalente.
- **Residuos.** La mayoría de los desinfectantes dejan un residuo en las superficies que se aplican, considerar el manejo de métodos para la eliminación de los residuos. El método más común es utilizar el 70% de alcohol isopropílico. Si hay más de un desinfectante que se utilizará en la superficie, la compatibilidad de los productos químicos necesita ser evaluado.
- **Método de aplicación.** El modo de aplicación del desinfectante puede afectar al resultado final en términos de las poblaciones microbianas debido a que algunos métodos mecánicos eliminan algunos microorganismos.

### 1.2.2. Clasificación

Los mecanismos por medio de los cuales los desinfectantes matan o inhiben la multiplicación de los microorganismos son variados y complejos estos se resumen en el *Cuadro 1*, en general todos los efectos observables de los agentes químicos sobre las bacterias son el resultado de alteraciones en sus componentes macromoleculares, algunos de estos cambios lesionan la membrana celular, otros inactivan de forma irreversible las proteínas y varios inducen un daño profundo en ácidos nucleicos como se muestra a continuación.<sup>9</sup>

**Cuadro 1.** Tabla resumen de desinfectantes. Clasificación y mecanismos de acción.<sup>3</sup>

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

### 1.2.2.1. Agentes que lesionan la membrana celular

La integridad estructural de la membrana depende de la disposición ordenada de las proteínas y los lípidos que la componen. Los solventes orgánicos y los detergentes alteran esta organización estructural, lo que interfiere sobre la función normal de la membrana. El efecto neto es la liberación de pequeños metabolitos de la célula y la interferencia sobre el transporte activo y el metabolismo energético.<sup>10</sup>

- **Tensoactivos:** Las sustancias que alteran las relaciones energéticas en las interfases al producir una reducción de la tensión superficial o interfásica se conocen como desinfectantes tensioactivos. Los agentes tensioactivos son compuestos que poseen grupos que atraen agua (hidrófilos) y grupos que la repelen (hidrófobos).
  - **Compuestos de amonio cuaternario:** Causan una desorganización de la estructura lipoproteica de la membrana celular.
    - **Agentes catiónicos:** Estos se disocian para dar carga positiva, tienen un átomo de nitrógeno cargado (grupo amonio) que es hidrófilo, con cuatro grupos orgánicos hidrófobos unidos. Son efectivos contra los microorganismos grampositivos y los virus que contengan membrana, pero relativamente poco eficaces contra las especies gramnegativas debido a su membrana externa lipopolisacárida, es necesario concentraciones elevadas. Las sales de amonio no son tóxicas, y las más conocidas son el cloruro de cetilpiridinio y el cloruro de benzalconio.
    - **Agentes aniónicos:** Entre los detergentes aniónicos se encuentran los jabones y los ácidos grasos que se disocian para dar un ion con carga negativa, estos agentes tienen mayor actividad a un pH ácido, en general tienen el mismo efecto que los catiónicos pero son menos efectivos.
- **Compuestos fenólicos:** En concentraciones bajas estos compuestos tienen acción bactericida rápida que provoca la pérdida del contenido celular y la inactivación irreversible de las oxidasas y las deshidrogenasas unidas a la membrana.

- **Cresoles:** Los cresoles son los fenoles alquílicos más simples. Los ortocresoles, metacresoles y paracresoles son compuestos mucho más activos que el fenol y en general se emplean como una mezcla (tricresol).
- **Difenólicos:** Los compuestos difenólicos halogenados presentan propiedades antibacterianas específicas. De estos compuestos el más importante es el derivado clorado, hexaclorofeno, que posee una alta efectividad contra microorganismos grampositivos, en especial estafilococos y estreptococos. El hexaclorofeno es bactericida cuando lo emplea en concentraciones altas.
- **Alcoholes:** El mecanismo de acción del alcohol depende en parte de su concentración, concentraciones de 50% (necesario alcanzar una cadena con un máximo de 5-8 átomos de carbono) en adelante disuelven membranas lipídicas, rompen la tensión superficial de la célula y comprometen íntegramente la membrana, el alcohol que ha entrado en el protoplasma desnatura las proteínas de coagulación, es decir; rompe la estructura terciaria por medio de sus enlaces disulfuro pero únicamente en soluciones de alcohol al 70% ya que las concentraciones más elevadas son menos potentes porque las proteínas no son fácilmente desnaturalizables en ausencia de agua; la causa es que el agua es necesaria para coagular las proteínas.<sup>9</sup>

Los alcoholes alifáticos, en especial el etanol, se han usado de forma amplia como desinfectantes de la piel por su acción bactericida y su capacidad para eliminar lípidos de las superficies cutáneas, sin embargo, su acción como desinfectante para destruir esporas a temperaturas normales es muy limitada. Es activo contra microorganismos grampositivos, gramnegativos y ácidosresistentes. La actividad bactericida del alcohol isopropílico es ligeramente superior a la del etanol y es menos volátil.

#### 1.2.2.2. Agentes que desnaturalizan proteínas

En su estado natural cada proteína tiene su conformación característica que es necesaria para su funcionamiento adecuado. Los agentes que alteran la conformación de las proteínas por desnaturalización producen un desplazamiento de la cadena polipeptídica de manera que las cadenas se presentan arrolladas o enrolladas al azar y de forma irregular.<sup>9</sup>

- **Ácidos y álcalis:** Los ácidos y los álcalis ejercen su actividad antibacteriana a través de sus iones  $H^+$  y  $OH^-$  libres, por medio de las moléculas no disociadas o por alteración del pH del medio en que se encuentra el microorganismo. Los ácidos minerales fuertes y los álcalis fuertes, presentan propiedades desinfectantes proporcionales a su grado de disociación en solución, sin embargo, algunos hidróxidos son más efectivos de lo que su grado de disociación podría indicar, lo que sugiere que el catión metálico también ejerce una acción tóxica directamente sobre el microorganismo.<sup>3</sup>

### 1.2.2.3. Agentes que modifican los grupos funcionales y ácidos nucleicos

El sitio catalítico de una enzima contiene grupos funcionales específicos que se unen al sustrato e inician los episodios catalíticos. La inhibición de la actividad enzimática se produce cuando uno o más de estos grupos funcionales es alterado o destruido. Los grupos funcionales importantes de la pared y la membrana o los ácidos nucleicos de la célula son susceptibles a la desactivación.<sup>9</sup>

- **Metales pesados:** Las sales solubles de mercurio, arsénico, plata y otros metales pesados envenenan la actividad enzimática formando mercaptidos con los grupos sulfhídrico de los residuos de cisteína.
  - **Mercuriales:** El cloruro de mercurio, alguna vez popular como desinfectante, es muy tóxico y en la actualidad tiene un uso limitado. Los mercuriales orgánicos, como el Metaphen, el Merthiolate y el Mercurocromo, son menos tóxicos y son usados como agentes antisépticos útiles. Las sales de fenilmercurio se encuentran entre los inhibidores más efectivos de bacterias grampositivas y gramnegativas, hongos, levaduras y algas.
  - **Compuestos de plata:** Los compuestos de plata se usan mucho como antisépticos, ya sea como sales solubles de plata o como preparados coloidales. Las sales de plata inorgánicas son agentes bactericidas eficaces, aunque su valor práctico está restringido a causa de sus efectos irritantes y cáusticos, la más empleada de las sales de plata es el nitrato de plata, que es altamente bactericida para el *gonococo* y se utiliza en solución al 1%.



- **Agentes oxidantes:** Dentro de este grupo los agentes antimicrobianos más útiles son los halógenos y el peróxido de hidrógeno, que inactivan las enzimas por conversión de los grupos funcionales -SH en la forma oxidada S-S. Los agentes más potentes también atacan grupos amino, grupos indol y el grupo hidroxifenólico de la tirosina.
  - **Cloro:** Es efectivo contra gran cantidad de microorganismos incluyendo a los que esporulan. Además del cloro propiamente dicho, existen tres tipos de compuestos clorados: los hipocloritos y las cloraminas orgánicas e inorgánicas, la acción desinfectante de todos los compuestos clorados se debe a la liberación de cloro libre, cuando se agrega cloro o hipocloritos al agua, el cloro reacciona con el agua para formar ácido hipocloroso, el cual en solución neutra o ácida es un agente oxidante fuerte y un desinfectante efectivo, la disociación del ácido hipocloroso depende del pH, que es el que determina la eficiencia de la desinfección. Es preciso mantener una concentración de 1000 ppm de cloro libre residual para asegurar una destrucción rápida.
  - **Yodo:** Tiene actividad casi exclusivamente bactericida, a valores de pH inferiores a 6 manifiesta la acción bactericida máxima, el índice germicida disminuye a medida que el pH se incrementa por encima de 7.5, el ión yoduro formado como resultado de la hidrólisis del yodo en soluciones acuosas, no tiene un efecto bactericida significativo. El uso principal del yodo es para la desinfección de la piel.
  - **Peróxido de hidrógeno:** La solución al 3% el peróxido de hidrógeno es un antiséptico inocuo pero muy débil cuyo uso principal es en la limpieza de heridas. Aunque la acción antibacteriana del peróxido de hidrogeno en general se atribuye a su capacidad oxidante, es probable que la formación del radical oxhidrilo del peróxido en la reacción dependiente de hierro sea responsable de la mayor parte de esta actividad. Útil como desinfectante de materiales inertes.
- **Colorantes:** Algunos de los colorantes del alquitrán de hulla, en especial los trifenilmetanos y las acridinas, no sólo tiñen a las bacterias sino que además son inhibidores en diluciones muy altas.<sup>9</sup>

- **Colorantes trifenilmetano:** Entré las anilinas derivadas del trifenilmetano, en especial el verde brillante, el verde de malaquita y el cristal violeta, han tenido muchas aplicaciones. La actividad de los colorantes trifenilmetano es una propiedad de la seudóbasa formada por la ionización del colorante, la seudóbasa es más liposoluble que el catión y es probable que sea ésta la forma en que gana el acceso al interior de la célula.
- **Colorantes de acridina:** Con frecuencia denominados "flavinas" debido a su color amarillo, interfieren sobre la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas tanto en las células bacterianas como en las células de mamíferos. Son moléculas heterocíclicas planares que interactúan con el DNA bicatenario helicoidal por intercalación, debido a su estructura hidrófoba plana, la acridina se inserta en el DNA entre dos bases sucesivas, separándolas de forma física.
- **Agentes alquilantes:** Los efectos letales del formaldehído, el óxido de etileno y el glutaraldehído resultan de su acción alquilante sobre las proteínas, la inhibición producida por estos agentes es irreversible, como consecuencia de una modificación de las enzimas y la inhibición de la actividad enzimática.
  - **Formaldehído:** Produce alquilación de los grupos carboxilo, oxhidrilo o sulfhidrilo por reemplazo directo de un átomo de hidrógeno por un grupo hidroximetilo. El formaldehído puede obtenerse comercialmente en una solución acuosa con 37% de formaldehído (formalina) o como paraformaldehído, un polímero sólido que contiene 91 a 99% de formaldehído. En general para este propósito se ha empleado formalina en concentraciones del 0,2 al 0,4%.
  - **Glutaraldehído:** El glutaraldehído es 10 veces más efectivo que el formaldehído como agente bactericida y esporicida y es considerablemente menos tóxico, su eficacia bactericida no disminuye a causa de la presencia de materiales que contengan proteínas, la forma de acción del glutaraldehído ha sido atribuida a su unión a grupos sulfhidrilo o amino, pero su blanco específico en la célula no se ha definido.
  - **Óxido de etileno:** Tiene actividad contra todos los tipos de bacterias, incluidas las esporas y los bacilos tuberculosos. La acción alquilante del óxido de etileno es responsable de su actividad bactericida, el anillo de

óxido de etileno se abre en presencia de un hidrógeno lábil y forma un radical hidroxietilo (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), el cual entonces se une a la proteína en la posición ocupada anteriormente por el hidrógeno. Su mayor aplicación reside en la esterilización.

### 1.2.3. Rotación

La base de la rotación de desinfectantes es dirigirse a un microorganismo que puede no ser destruido por un desinfectante en particular con otro que sea efectivo contra tal microorganismo.

La rotación puede ser diseñada de tal forma que se cambie el desinfectante desde periodos semanales hasta periodos semestrales o anuales según la evaluación previa a la implementación de la rotación. El utilizar periodos tan largos en el cambio de desinfectantes se debe a que los microorganismos no desarrollan resistencia a los agentes químicos, la teoría de la resistencia de los microorganismos fue tomada de la industria médica donde los microorganismos forman cierta resistencia a los antibióticos en el cuerpo humano. El mecanismo por el cual trabaja un desinfectante y un antibiótico es diferente, la selección natural es un proceso lento que requiere grandes poblaciones de células, una presión selectiva constante y un medio rico de crecimiento por lo que en un ambiente controlado no se presenta<sup>2</sup>.

### 1.2.4. Niveles de desinfección<sup>6</sup>

Se han definido tres niveles de desinfección: alta, intermedia y baja según la intensidad de su actividad sobre bacterias, hongos, virus (lipídicos y no lipídicos) y esporas como se muestra en el *cuadro 2*.

**Cuadro 2.** Nivel de los desinfectantes.<sup>6,11</sup>

NIVEL	FUNCIÓN
Alta (DAN)	Es realizada con agentes químicos que eliminan a todos los microorganismos incluyendo los virus resistentes y esporas bacterianas.
Intermedia (DNI)	Es realizada con agentes químicos que eliminan bacterias vegetativas, micobacterias, hongos, virus con envoltura y algunos virus con envoltura.
Baja (DBN)	Es realizado por agentes químicos que eliminan bacterias vegetativas, hongos y algunos virus con envoltura y sin envoltura

## **1.2.5. Factores que influyen en la eficacia del desinfectante**

### **1.2.5.1. Concentración del agente**

Muchos agentes son letales para las bacterias sólo cuando se los usa en concentraciones muy elevadas, otros en concentraciones muy bajas pueden estimular, retardar o hasta destruir al microorganismo, sin embargo la concentración necesaria para producir un efecto determinado, así como el espectro de concentraciones dentro del cual un efecto determinado es demostrable varían con el desinfectante, el microorganismo y el método de ensayo. Existe una relación estrecha entre la concentración de la sustancia empleada y el tiempo necesario para destruir una determinada fracción de la población, esta relación se indica por la expresión:

$$C^n t = k$$

donde  $C$  es la concentración de la sustancia,  $t$  es el tiempo necesario para destruir una determinada fracción de las células,  $n$  y  $K$  son constantes.<sup>12</sup>

### **1.2.5.2. Tiempo**

Cuando las bacterias se exponen a una concentración específica del agente bactericida, aun en exceso, no todos los microorganismos mueren al mismo tiempo sino que más bien se produce una disminución gradual en el número de células viables. Habitualmente se considera que la desinfección es un proceso en el cual las bacterias resultan destruidas en el curso de un período razonable de tiempo, pero existen diferentes opiniones sobre cuál debería ser este tiempo.<sup>10</sup>

### **1.2.5.3. pH**

La concentración del ion hidrógeno influye sobre la acción bactericida al afectar tanto al microorganismo como al agente químico. Cuando las bacterias están suspendidas en un medio de cultivo de pH 7 tienen carga negativa. Un aumento del pH aumenta la carga y puede alterar la concentración efectiva del agente químico sobre la superficie de la célula, el pH también determina el grado de ionización del producto químico. En general la forma no ionizada de un agente disociable pasa a través de la membrana celular con mayor facilidad que las formas iónicas relativamente inactivas.

### **1.2.5.4. Temperatura**

La destrucción de las bacterias por los agentes químicos aumenta junto con la temperatura, a temperaturas bajas por cada 10° C de incremento de la temperatura se produce una duplicación del índice germicida. En el caso de algunos agentes como el

fenol, el índice se incrementa de cinco a ocho veces lo que sugiere una reacción más compleja y la participación de factores adicionales.

#### **1.2.5.5. Naturaleza del microorganismo**

La eficacia de un agente determinado depende de las propiedades del microorganismo contra el cual se esté probando. Las más importantes de estas propiedades consisten en la especie de microorganismo, la fase del cultivo, la presencia de estructuras especiales, como esporas o cápsulas, los antecedentes del cultivo y el número de microorganismos en el sistema en ensayo.

#### **1.2.5.6. Biocarga**

Se debe tomar en cuenta la cantidad de bacterias que se encuentran, aun en exceso el agente bactericida no destruye todos los microorganismos pero si produce una disminución gradual en el número de células viables.

#### **1.2.5.7. Presencia de materiales extraños**

La presencia de materia orgánica, como suero, sangre o pus, influye sobre la actividad de muchos desinfectantes, y transforma en inertes a sustancias que son muy activas en su ausencia. Estos materiales extraños alteran la actividad del desinfectante de diferentes maneras: absorción superficial del desinfectante por coloides proteícos, formación de un compuesto químicamente inerte o menos activo y unión al desinfectante de grupos activos de las proteínas extrañas.

### **1.2.6. Técnicas para la evaluación de los desinfectantes**

#### **1.2.6.1. Método del disco de papel**

Se impregna un pequeño disco de papel filtro con una dilución del germicida; a continuación se coloca el disco en la superficie de una caja Petri con un medio de agar, que previamente habrá sido sembrada con el microorganismo control.

Después de un periodo de incubación se desarrollara un crecimiento bacteriano uniforme que dejara un halo claro de inhibición alrededor del disco. Este método no es preciso ni reproducible, pero el tamaño del halo de inhibición será un índice útil para estudiar la actividad del germicida.<sup>11</sup>

### **1.2.6.2. Dilución en tubo**

Consiste en realizar diferentes diluciones del agente químico, el mismo volumen de cada dilución se dispensa en tubos estériles, a cada tubo se le añade la misma cantidad del microorganismo utilizado como prueba. A determinados intervalos de tiempo se transfiere una alícuota de cada tubo a otro tubo que contenga medio de cultivo.

Estos tubos inoculados se incuban a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo utilizado como prueba durante 24 a 48 hs, al cabo de este tiempo se examina el crecimiento del microorganismo utilizado mediante la aparición de turbidez en el tubo o ausencia de turbidez. Aquellos tubos que no presenten crecimiento indican la dilución a la cual ese agente químico mata al microorganismo expuesto durante ese periodo de tiempo.<sup>13</sup>

### **1.2.6.3. Coeficiente Fenólico**

Es una técnica de estandarización para determinar la eficacia bactericida de un compuesto químico con relación al fenol. Se valoran las muestras después de cinco, diez y quince minutos de exposición. Es una modificación de la técnica de dilución en tubo tal como se describe a continuación:

- 1) Se prepara una serie de tubos conteniendo cada uno 5 mL de diferentes diluciones del desinfectante.
- 2) A la vez se preparara una segunda serie de tubos que contengan diferentes diluciones de fenol.
- 3) Cada tubo de las dos series se inocula con 0.5 mL de un cultivo de 24 hs del microorganismo utilizado como prueba.
- 4) A los cinco, diez y quince minutos se recoge una alícuota de cada tubo que se inocula en otro tubo que contenga medio de cultivo estéril.
- 5) Los tubos inoculados se incuban durante 24 a 48 hs y se observa el crecimiento del microorganismo (turbidez).
- 6) La mayor dilución del desinfectante que destruya a los microorganismos en diez minutos pero no los destruya en cinco minutos, se divide por la dilución mayor de fenol que dé los mismos resultados. El número obtenido es el coeficiente fenólico de ese desinfectante.<sup>11</sup>

#### 1.2.6.4. Recuento en placa

Las diluciones del microorganismo se vierten en medio de cultivo sólido junto con una concentración del desinfectante y se incuba. Luego del periodo de incubación se observa la ausencia o disminución del crecimiento microbiano. Con el resultado obtenido del recuento en placa se puede determinar hasta que concentración actúa el desinfectante sobre una determinada concentración de microorganismos.

Al cabo de 24 a 48 hs se observan zonas de inhibición alrededor del agente químico. Una modificación de esta técnica es la incorporación del agente químico en el medio de cultivo antes de verterlo sobre la placa. Una vez solidificado se inocula con el microorganismo utilizado como prueba, se incuba y se examina el crecimiento microbiano.<sup>13</sup>

#### 1.2.7. Microorganismos control

Para la evaluación de los desinfectantes que se utilizan en instalaciones farmacéuticas se utilizan microorganismos de la American Type Culture Collection (ATCC), así como aislamientos ambientales. El objetivo es seleccionar un grupo de organismos que representan todo el espectro del reino Monera y Fungi<sup>9</sup>:

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

Los organismos usualmente utilizados en los estudios de desinfectantes por las industrias farmacéuticas son las siguientes<sup>8</sup>:

- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Bacillus subtilis*
- *Candida albicans*
- *Aspergillus niger*

### **1.2.8. Ensayos en superficies**

Después de completar la evaluación de la eficacia del desinfectante bajo condiciones de laboratorio, se concluye con pruebas realizadas en las áreas reales y en el equipo que será desinfectado de forma rutinaria, estas pruebas se conocen como ensayos *in situ*. La clave de este ensayo es que los microorganismos no se introducirán a las zonas o piezas de equipo y consistirán en la realización de la determinación de la carga biológica antes y después de los procedimientos de desinfección.<sup>9</sup>

Ejemplo de un estudio *in situ*:

- Probar la existencia de carga biológica antes de la limpieza y desinfección
- Proceda a limpiar y desinfectar utilizando los procedimientos validados previamente.
- Llevar a cabo la determinación de la biocarga después de los tiempos de contacto.
- Los resultados muestran menores recuentos microbianos después de la limpieza y desinfección.

Estos resultados son la demostración final de que el desinfectante, el modo de aplicación, y el tiempo de contacto fueron elegidos adecuadamente para cada área o pieza de equipo.<sup>9</sup>

## **1.3. NMX-BB-040-SCFI-1999<sup>14</sup>**

### **1.3.1. Objetivo**

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

### **1.3.2. Campo de aplicación**

Esta norma mexicana es aplicable a los productos germicidas, siempre y cuando así se indique.

### **1.3.3. Fundamento**

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



## **1.4. Microorganismos de prueba**

La actividad antimicrobiana es la propiedad que tiene una sustancia de inhibir o matar a los microorganismos. Para su determinación, los microorganismos de prueba que se utilizan son *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

### **1.4.1. *Escherichia coli***

Es la bacteria más encontrada en las materias fecales del hombre y especies animales. Se establece en el intestino delgado y grueso, forma parte de la biota intestinal y se encuentra en calidad de saprobio sin causar daño, producen sustancias que son útiles al hospedero, como son las colicinas, que tienen efectos inhibitorios sobre otras cepas potencialmente patógenas por lo que la colonización del intestino es benéfica para el hospedero.

*Escherichia coli* es la especie que más predomina de la flora anaeróbica facultativa del colon humano. Las infecciones producidas por cepas de *E.coli* patógenas pueden estar limitadas a mucosas o bien diseminarse provocando cuatro síndromes clínicos: infección de vías urinarias, sepsis, meningitis y enfermedad diarreica.<sup>15</sup>

#### **1.4.1.1. Morfología**

Es un bacilo Gram negativo, pequeños, oblongos, finos; con dimensiones de 0.5 X 1.0 a 3.0 micras y se mueve por medio de flagelos peritricos, con una sola cadena espiral de ADN, móvil, aerobio y anaerobio facultativo, además posee apéndices filamentosos de naturaleza proteica frecuentemente portadoras de adhesinas, que presentan la propiedad de combinarse con receptores de naturaleza polisacárida localizados en la superficie de las células epiteliales llamados pilis o fimbrias, muchas cepas producen una pequeña microcápsula, muy pocas elaboran macrocápsulas y no fabrican esporas; en las pruebas bioquímicas es positiva al indol, decarboxilasa de lisina, fermentación de manitol y gas a partir de la glucosa; además es lactosa positiva en el 90% de las cepas con citrato negativo. Tiene información genética en los plásmidos, que son responsables por la producción de toxinas y la resistencia a los antimicrobianos. El genoma de *Escherichia coli* contiene un total de 5000 genes.<sup>15</sup>

#### **1.4.1.2. Características de cultivo**

En medios sólidos las colonias son circulares y lisas, con bordes bien definidos y en algunos medios diferenciales como EMB presentan brillo metálico característico, ciertas

cepas al crecer en un medio de gelosa sangre producen  $\alpha$  o  $\beta$  hemólisis. El crecimiento óptimo ocurre a temperatura entre 20 y 40° C, y en pH entre 6 y 8, en medio líquido las cepas lisas producen una turbidez uniforme, mientras que las cepas rugosas se asientan en el fondo formando un depósito granular.<sup>16</sup>

#### 1.4.1.3. Patogenicidad

Al colonizar tejidos extraintestinales, *Escherichia coli* produce procesos inflamatorios piógenos similares a otras bacterias y, en ocasiones, de mayor intensidad por los factores propios de esta bacterias. Es la bacteria que produce más infecciones en los hospitales. Puede infectar las vías respiratorias y las meninges, como consecuencia de una invasión a circulación sanguínea. Las septicemias por *E.coli* son muy preocupantes por la gravedad de su pronóstico, se pueden instalar en el hígado, vías respiratorias u otros órganos cuando hay una perforación intestinal, siendo responsable de la peritonitis consecutiva a dicha lesión. Las infecciones urinarias son producidas por *E. coli* en más del 70% de los casos, según algunas estadísticas, y puede ser el agente etiológico de la enteritis y la enterocolitis (diarreas del turista).<sup>15</sup>

A menudo se considera que las enterobacterias aprovechan su abundante presencia en el ambiente y la flora normal para producir enfermedades en cuanto logran acceso a los sitios del cuerpo estériles en condiciones normales.<sup>17</sup> Sin embargo, dentro de la especie se encuentran cepas patógenas que causan distintos síndromes diarreicos en la que el intestino no trabaja en forma normal, absorbe menos agua y sales hacia la sangre, elimina más agua y sales desde la sangre hacia el intestino, es por esto que se pierden en las heces más agua y sales de lo normal. Esta mayor pérdida de agua y sales del cuerpo resulta, en deshidratación, la cual también puede estar causada por vómitos, que con frecuencia acompañan a la diarrea y sucede más rápidamente en infantes (menores de un año) y niños pequeños, en climas calientes y cuando hay fiebre. Se les ha clasificado en cinco categorías, de acuerdo a sus propiedades de virulencia, interacción con la mucosa intestinal, cuadro clínico, epidemiología y serotipos O y H:

- *E. coli* entero toxigénica (ECET)
- *E. coli* entero patogénica (ECEP)
- *E. coli* entero hemorrágica (ECEH)
- *E. coli* entero invasiva (ECEI)
- *E. coli* entero agregativa (ECEA)<sup>17</sup>

La cepa *Escherichia coli* O111 provoca fuertes calambres abdominales (a veces confundidos con apendicitis) y diarrea sanguinolenta<sup>19</sup>. La cepa 11229 es utilizada para pruebas de antimicrobianos, desinfectantes, en alimentos y ensayos de inhibición.

### **1.4.2. *Staphylococcus aureus***

La mayoría de los seres humanos son portadores de gran número de estafilococos y de microorganismos afines, en la nariz y la piel. Uno de ellos *Staphylococcus aureus* que es un miembro temporal o transitorio de la flora microbiana, aunque *Staphylococcus aureus* es a menudo residente habitual en individuos sanos, en ciertas circunstancias produce infecciones graves y puede matar a su huésped. Debido a su frecuente presencia en la superficie corporal, se encuentra en posición propicia para invadir siempre que se debiliten las defensas, aunque sea en grado mínimo. En consecuencia, es la causa más común de infecciones de las heridas quirúrgicas y traumáticas y de las infecciones superficiales de la piel.<sup>16</sup>

#### **1.4.2.1. Morfología**

Los microorganismos del género *Staphylococcus*, son cocos grampositivos, dispuestos en racimos o apiñamientos irregulares semejantes a los de las uvas, su diámetro medio es 1  $\mu\text{m}$  y depende de la edad del cultivo, así como del tipo del medio de cultivo empleado, los cultivos más viejos presentan más formas individuales y ensanchadas, que a menudo aparecen como gramnegativas. En cultivos en caldo, son muy visibles o aparentes las individuales, los pares, y las de cadena corta, las cadenas más largas se observan pocas veces.<sup>20</sup>

#### **1.4.2.2. Características de cultivo**

*Staphylococcus* es aerobio y anaerobio facultativo. Crecen bien en medios simples, a temperaturas que van de 10° a 42°C. La temperatura óptima para su desarrollo es de 36°C y el pH óptimo es 7.4; los estafilococos crecen bien en medios que contienen hasta un 10% de cloruro sódico, por tanto, el medio denominado "agar con manitol y sal" se puede utilizar para la diferenciación de las especies. Solo unas cuantas cepas producen un crecimiento escaso en agar de MacConkey. En agar con sangre a las 24 hs a 37° C, las colonias son circulares, convexas bajas, enteras, opacas, brillantes y butirosas, algunas cepas producen hemólisis, todas ellas producen pigmentación que va desde el blanco cremoso hasta el dorado profundo, la pigmentación ya no constituye un criterio confiable para la clasificación.<sup>20</sup>

### 1.4.2.3. Patogenicidad

La patogenicidad de *Staphylococcus* tiene relación con la capacidad del organismo para producir varias toxinas. La enterotoxina, que es una de ellas, se debe un tipo común de envenenamiento con alimentos, la ingestión de cantidades relativamente pequeñas de enterotoxina produce vómito y diarrea a las cuatro o seis horas. Por otra parte, la exotoxina causa necrosis de la piel y lisis de los eritrocitos durante la formación y evolución de diviesos o abscesos localizados. De estas inflamaciones locales, los organismos se diseminan frecuentemente por conducto de los vasos linfáticos y de la corriente sanguínea, de allí que las infecciones estafilocócicas se vuelvan a menudo enfermedades más graves, tales como neumonía, meningitis, endocarditis y muchas otras.<sup>20</sup>

Algunas cepas de *S. aureus* tienen cápsulas que inhiben la eritrocitosis de los leucocitos polimorfonucleares, a menos que estén presentes anticuerpo específicos. La mayor parte de las cepas de *S. aureus* tienen coagulasa en la superficie de la pared celular, la coagulasa se fija de manera no enzimática con el fibrinógeno y de esta manera hay segregación bacteriana.<sup>21</sup> La cepa 6538 es utilizada para pruebas de antimicrobianos, desinfectantes, en alimentos, ensayos de inhibición y control de calidad.

### 1.5. Microorganismos comunes en superficies

Las superficies suelen tener considerable importancia como hábitat microbiano debido a que adsorben nutrientes. En el microambiente de una superficie, las concentraciones de nutrientes pueden ser superiores a las de otros medios con agua.<sup>22</sup>

Las bacterias que se pueden encontrar son microorganismos relativamente fijos, que van de los no patógenos o potencialmente patógenos, a los patógenos dependiendo del ambiente en cuestión, sin embargo los que se presentan con regularidad son *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmolla enterica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *bacillus cereus*, además de algunos hongos como *Trichophyton mentagrophytes*.<sup>7, 22, 23</sup>

### 1.6. Sanitizantes

A continuación se detallan las propiedades de los sanitizantes utilizados para las pruebas.

## 1.6.1. Etanol

### 1.6.1.1. Fórmula

- Fórmula empírica  $C_2H_6O$
- Peso molecular 46.07g/mol

### 1.6.1.2. Descripción

El alcohol es un líquido claro, incoloro, móvil y volátil con un ligero olor característico y sabor a quemado<sup>24</sup>

### 1.6.1.3. Propiedades

- Punto de ebullición: 78.15° C
- Punto de inflamación: 14° C (en vaso cerrado)
- Solubilidad: miscible con cloroformo, éter, glicerina, y agua (con aumento de la temperatura y la contracción de volumen)
- Densidad en gramos al 70% 0.888-0.883 g/mL
- pKa 15.9 (25° C)
- Nota: Estas propiedades son típicas para el alcohol (etanol 95% o 96% v/v)<sup>25,26</sup>

### 1.6.1.4. Usos

Se utiliza como disolvente, antiséptico, desinfectante y penetrante de la piel.<sup>25,27</sup>

El etanol en solución acuosa en diferentes concentraciones, es ampliamente usado en diversas formulaciones farmacéuticas y en la cosmética, aunque el etanol es usado más como solvente se emplea en soluciones como un antimicrobiano, las soluciones de etanol tópico son empleados como potenciadores de penetración y como desinfectantes (*cuadro 3*). El etanol es también usado en preparaciones transdérmicas en combinación con labrasol como un cosurfactante.<sup>25</sup>

**Cuadro 3.** Actividad antimicrobiana de etanol<sup>11, 29</sup>

Sanitizante	Microorganismos					
	Bacterias		Micobacterias	Esporas	Hongos y levaduras	Virus
	Gram +	Gram -				
Etanol	+++	+++	+	-	++	++

(+++) Buena, (++) Moderada, (±) Regular, (-) Nula.

Ejerce una acción bactericida frente a las bacterias en fase vegetativa, las micobacterias, algunos hongos y los virus lipídicos, no obstante no es activo contra las esporas bacterianas, y tiene incapacidad para penetrar materiales ricos en proteínas. Las soluciones acuosas de etanol al 70% (v/v) pueden utilizarse en la piel, las superficies de trabajo de las mesas de laboratorio, para la limpieza de tapones de caucho de frascos de medicamentos, desinfección de superficies externas de equipos, áreas de preparación de medicamentos. Su uso a nivel industrial es restringido, están dirigidos a uso clínico.<sup>26</sup>

#### **1.6.1.5. Precauciones**

- Tóxico si se ingiere en concentraciones elevadas.
- Fácilmente inflamable.
- Puede ser irritante para los ojos y las membranas mucosas.

#### **1.6.2. Hipoclorito de sodio**

##### **1.6.2.1. Fórmula**

- Fórmula empírica NaClO
- Peso molecular 74.44 g/mol

##### **1.6.2.2. Descripción**

Sólido cristalino blanco de olor fuerte muy inestable, comúnmente encontrado en soluciones acuosas como líquido incoloro con olor fuerte.<sup>24</sup>

##### **1.6.2.3. Propiedades**

- Densidad 1110kg/m<sup>3</sup>; 1,11 g/cm<sup>3</sup>
- Punto de fusión 291 K (18° C)
- Punto de ebullición 374 K (101° C)
- pK<sub>a</sub> 7
- Incompatible con ácidos fuertes, aminas y amoniaco
- Reacciona violentamente con sales de amonio, metanol, aziridina y feniloacetnitrilo
- Solubilidad en agua: 29.3 g/100mL (0° C) <sup>24</sup>

### 1.6.2.4. Usos

El cloro, oxidante de acción rápida, es un antimicrobiano (*cuadro 4*) de uso muy extendido y de amplio espectro. Normalmente se vende en forma de lejía, una solución acuosa de hipoclorito sódico (NaOCl) que puede diluirse en agua para conseguir distintas concentraciones de cloro libre.<sup>28</sup>

**Cuadro 4.** Actividad antimicrobiana del Hipoclorito de sodio<sup>11, 28</sup>

Sanitizante	Microorganismos					
	Bacterias		Micobacterias	Esporas	Hongos y levaduras	Virus
	Gram +	Gram -				
Hipoclorito de sodio	+++	+++	+	±	++	++

(+++) Buena, (++) Moderada, (±) Regular, (-) Nula.

La frecuencia con la que deben prepararse nuevas soluciones de trabajo de lejía depende de su potencia inicial, del tamaño y el tipo de los recipientes (por ejemplo, con o sin tapa), de la frecuencia y el tipo de uso, y de las condiciones ambientales.<sup>28</sup>

Como solución desinfectante general para toda clase de trabajos de laboratorio se utiliza a una concentración de 1 g/L de cloro libre (1000 ppm). A 1000 ppm tiene efecto contra bacterias, hongos, protozoos, micobacterias y también destruye virus y algunas endosporas bacterianas. Su actividad se ve considerablemente reducida por la materia orgánica (proteínas), las soluciones de hipoclorito sódico, como la lejía de uso doméstico, contienen 50 g/L de cloro libre y por tanto deben diluirse a razón de 1:50 o 1:10 para obtener concentraciones finales de 1 g/L y 5 g/L, respectivamente (*Cuadro 5*). Los gránulos o comprimidos de hipoclorito cálcico (Ca(ClO)<sub>2</sub>) suelen contener alrededor de un 70% de cloro libre. La lejía no se recomienda como antiséptico, pero puede utilizarse para desinfectar agua para beber con una concentración final de 1–2 mg/L de cloro libre.<sup>28</sup>

**Cuadro 5.** Diluciones recomendadas de compuestos que liberan cloro<sup>28</sup>

	SITUACIONES LIMPIAS	SITUACIONES SUCIAS
Cloro libre requerido	0,1% (1g/L)	0,5% (5g/L)
Solución de hipoclorito sódico (5% de cloro libre)	20 mL/L	100 mL/L
Hipoclorito cálcico (70% de cloro libre)	1,4 g/L	7,0 g/L
Dicloroisocianurato sódico en polvo (60% de cloro libre)	1,7 g/L	8,5 g/L
Dicloroisocianurato sódico en comprimidos (1,5g de cloro libre comprimido)	Un comprimido por Litro	Cuatro comprimidos por Litro

#### 1.6.2.5. Precauciones

- Tóxico por ingestión en concentraciones elevadas.
- En forma de lejía puede ser corrosivo para los metales.
- El cloro gaseoso es sumamente tóxico, por esa razón debe almacenarse y utilizarse solamente en zonas bien ventiladas.
- No mezclarse con ácidos para evitar la liberación rápida de cloro gaseoso.

#### 1.6.3. Cloruro de benzalconio

##### 1.6.3.1. Fórmula

- Fórmula empírica  $C_{21}H_{38}ClN$
- Peso molecular 339.98 g/mol

##### 1.6.3.2. Descripción

Polvo cristalino blanco o amarillo claro, o en trozos gelatinosos, tiene olor y sabor muy amargo, en solución acuosa es incoloro.<sup>25</sup>

##### 1.6.3.3. Propiedades

- Punto de fusión 250° C
- Densidad 0.98 g/cm<sup>3</sup>
- Higroscópico
- Muy soluble en agua, alcohol, cetona; ligeramente soluble en benceno, casi insoluble en éter
- Incompatibilidad con agentes oxidantes fuertes

##### 1.6.3.4. Usos

Los cloruros de amonio cuaternario son conocidos por su eficacia y facilidad de uso, generalmente estos no son caros y proporcionan buenos resultados en el medio ambiente.<sup>28</sup> Los cloruros de amonio cuaternario son particularmente activos a un pH alcalino, son comúnmente usados en el saneamiento del ambiente y de superficies no críticas, como pisos, paredes y muebles, son ampliamente utilizados como desinfectantes, son compuestos que no manchan, son inodoros, no corrosivos y relativamente no tóxicos.



**Cuadro 6.** Actividad antimicrobiana del cloruro de benzalconio<sup>11, 31</sup>

Sanitizante	Microorganismos					
	Bacterias		Micobacterias	Esporas	Hongos y levaduras	Virus
	Gram +	Gram -				
Cloruro de benzalconio	+++	+	±	-	+	±

(+++) Buena, (++) Moderada, (±) Regular, (-) Nula.

Los cloruros de amonio cuaternarios son efectivos principalmente contra bacterias grampositivas pero actúan bien contra gramnegativas<sup>31</sup> (*cuadro 6*), también presentan actividad fungicida y virucida sobre virus con envoltura, y casi nula actividad frente a micobacterias y esporas, concentraciones de uso 1:50<sup>32</sup>

#### 1.6.3.5. Precauciones

- Tóxico si se ingiere en concentraciones elevadas.
- Fuerte irritante en ojos y vías respiratorias.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La desinfección constituye una de las operaciones más importantes en laboratorios donde se fabrican medicamentos o manipulan muestras biológicas, ya que permite controlar la presencia de microorganismos en las superficies y ambientes de trabajo, equipos, instrumentos, etc. de forma que se logra evitar la contaminación de los productos fabricados o un posible contagio, garantizando la calidad de los productos.<sup>31</sup>

Usualmente en los laboratorios de Microbiología General II y laboratorio I PA de la UMIEZ de la FES Zaragoza los estudiantes usan sanitizantes como el hipoclorito de sodio y etanol así como el cloruro de benzalconio para sanitizar sus mesas de trabajo antes y después de las prácticas, es posible que no se conozca realmente la eficacia de estos productos para garantizar un área de trabajo libre de partículas viables, evitando así una posible contaminación de las sustancias y productos que los estudiantes utilizan. Es por ello que se evalúa la actividad antimicrobiana de estos tres sanitizantes usados con frecuencia en los laboratorios para comprobar su eficacia con base en los requisitos de la norma mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999.

Se espera una disminución de al menos 99% de los microorganismos de prueba *Escherichia coli* ATCC 11229 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 especificados en la norma NMX-BB-040-SCFI-1999 y comprobar que estos sanitizantes son confiables para la sanitización de los laboratorios.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. General

- Evaluar la actividad antimicrobiana de tres sanitizantes usados frecuentemente por los estudiantes en los laboratorios de Microbiología General II y laboratorio I PA de Investigación de la UMIEZ de la FES Zaragoza en base a la norma NMX-BB-040-SCFI-1999 y posteriormente en un ensayo en superficie.

#### 3.2. Particulares

- Determinar el porcentaje de reducción de microorganismos, a partir de la cuenta viable inicial y de células sobrevivientes, y verificar el cumplimiento en base a la norma.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los sanitizantes en una superficie observando la reducción de la carga microbiana presente en diferentes tiempos.

### 4. HIPÓTESIS

- Se espera que si los sanitizantes utilizados en los laboratorios de MG II y de Investigación de la UMIEZ de la FES Zaragoza presentan un porcentaje de eficiencia de al menos 99% con las cepas *Escherichia coli* ATCC 11229 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, disminuirán de forma sustancial la carga bacteriana en superficies.

## **5. TIPO DE ESTUDIO**

### **5.1. Tipo de estudio:**

- Experimental, prospectivo y transversal.

### **5.2. Población estudio:**

- Sanitizantes (etanol, hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio)

### **5.3. Criterios de inclusión:**

- Sanitizantes usados en los laboratorios de Microbiología General II y Laboratorio 1 PA de la UMIEZ de la FES Zaragoza
- Sin señales de partículas extrañas

### **5.4. Criterios de exclusión:**

- Sanitizantes con un tiempo prolongado de antigüedad
- Deja residuos en las superficies aplicadas

### **5.5. Variables:**

#### **5.5.1. Dependientes:**

- Carga microbiana
- Escala ordinal

#### **5.5.2. Independientes:**

- Sanitizantes
- Escala ordinal

## 6. DISEÑO METODOLOGICO

### 6.1. Material y Equipo

- Balanza analítica – Ohaus Explorer plus
- Termómetro Brannan (-10° a 250° C)
- Probeta 100 mL – Pyrex
- Vasos de precipitados 100 mL– Pyrex
- Matraz volumétrico 250 mL – Pyrex
- Pipeta graduada 10 mL – Pyrex
- Agitador de vidrio – Pyrex
- Matraz erlenmeyer 250 mL – Pyrex
- Espectrofotómetro (20+ ) ThermoScientific
- Autoclave – Steele
- Incubadora – Shellab
- Microscopio – Primostar Microscopia Zeiss
- Vortex – Scientific Industries Ing SA
- Pipeta automática 100 µL– Labnet
- Pipeta automática 100 –1000 µL – Labnet
- Pipeta automática – Power pette
- Cajas de Petri – Pyrex
- Tubos de ensayo con tapa de rosca de 20 mm X 150 mm – Pyrex
- Vasos de precipitados 50 mL – Pyrex
- Pipetas graduadas 10 mL – Pyrex
- Tripie – AESA
- Mechero Fischer – AESA

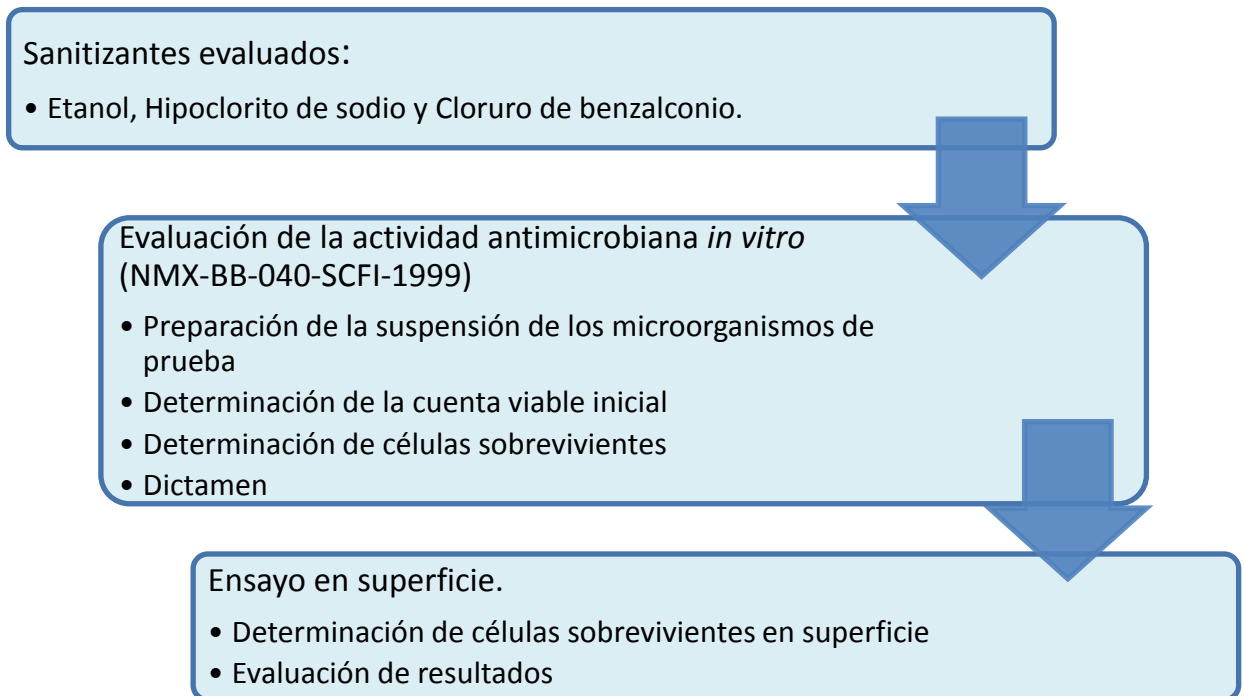
### 6.2. Medios y Reactivos

- Agar para métodos estándar – Becton Dickinson
- Agar Soya tripticaseína – Bioxon
- Caldo soya tripticaseína – Bioxon
- Fosfato monobásico de potasio - Baker analyzed
- Lecitina de soya
- Polisorbato 80
- Agua destilada –Theissier
- Hidróxido de sodio – Merck

- Ácido clorhídrico – EM Science
- Cloruro de bario – Baker analyzed
- Ácido sulfúrico concentrado – Grado reactivo Reasol
- Aceite de inmersión – CTR Scientific

### 6.3. Metodología

#### 6.3.1. Diagrama de bloques



#### 6.3.2. Sanitizantes a usar

Etanol (solución al 70%), Hipoclorito de sodio (solución comercial diluida a 1000 ppm aprox.), Cloruro de benzalconio (solución comercial 1:100) que cumplen con los criterios de inclusión.

Los sanitizantes usados en los laboratorios de Microbiología General II y laboratorio I planta alta de la UMIEZ son iguales a excepción del cloruro de benzalconio donde se usa principalmente en el laboratorio de la UMIEZ, las concentraciones usadas son las mismas ya que el etanol está al 70% y se vende comercialmente a esa concentración, el cloruro

de benzalconio es una solución comercial lista para usarse que tiene una concentración de 1:100, el hipoclorito de sodio es el único que se vende en solución concentrada (5% de cloro libre), por lo cual se pueden preparar múltiples diluciones de ella, la concentración usada en el laboratorio de la UMIEZ es a 1000 ppm aproximadamente, los estudiantes de MG II utilizan concentraciones en ocasiones superiores a 1000 ppm, sin embargo; se usó como referencia una solución a 1000 ppm.

#### Microorganismos de prueba

<i>Staphylococcus aureus</i>	A T C C 6538
<i>Escherichia coli</i>	A T C C 11229

#### Selección de la muestra

Para el análisis se seleccionó una muestra representativa del producto a analizar de manera aleatoria.

#### **6.3.3. Preparación y acondicionamiento de la muestra**

##### Conservación de los microorganismos de prueba:

Conservar las cepas de microorganismos sembrándolos cada semana en tubos de 16 mm X 125 mm con 7 mL de agar nutritivo inclinado, incubar a una temperatura de 35° C a 37° C de 20 a 24 hs y mantenerlos en refrigeración. La preparación de medio y reactivos está en el *anexo I*.

#### **6.3.4. Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba:**

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

Remover el crecimiento del primer tubo con 5 mL de solución salina, con esta misma suspensión remover el crecimiento del segundo tubo , y así consecutivamente hasta llegar al cuarto tubo, transferir el sobrenadante a un tubo de ensayo estéril y continuar

diluyendo con solución salina, si es necesario, hasta obtener una suspensión con la misma opacidad del tubo 8 de la escala de Mc Farland (*ver anexo II*), leer la suspensión a una longitud de onda de 580 nm, esta debe dar una lectura entre 3% y 5% de transmitancia, de no ser así diluir con solución salina.

### **6.3.5. Determinación de la cuenta viable inicial**

1. A un tubo de ensaye que contenga 9.9 mL de la solución amortiguadora de fosfatos diluida estéril, transferir 0.1 mL de la suspensión de los microorganismos de prueba y efectuar siete diluciones más, hasta llegar a la dilución decimal  $10^{-14}$ . El número de diluciones puede variar dependiendo del microorganismo.
2. Colocar en cuatro tubos de ensaye de 22 X 175 mm, 15 mL de agar para métodos estándar a una temperatura de 45° C, agregar a cada tubo 1 mL de cada dilución, homogeneizar en un vórtex, vaciar a las placas y dejar solidificar invertir las cajas de Petri e incubar a 308 K - 310 K (35° C – 37° C) durante 48 hs. Contar las colonias contenidas en cada una de las cajas, en un cuenta colonias y registrar el número de colonias formadas, y elegir aquella dilución en la cual el número de colonias se encuentre entre 25 y 250 para la determinación de células sobrevivientes.

### **6.3.6. Determinación de las células sobrevivientes**

#### Inoculación de la muestra

1. Para cada uno de los microorganismos de prueba, medir por duplicado 9.8 mL del desinfectante, transferir a tubo de ensaye con tapa de rosca de 22 X 175 mm estériles.
2. Inocular en forma individual cada tubo con 0.2 mL de la suspensión de cada uno de los microorganismos de prueba, (de la dilución decimal elegida previamente en la determinación de cuenta viable inicial) en el centro, evitando tocar con la punta, las paredes.
3. Agitar el sanitizante con la muestra inoculada, en un vortex, exactamente 30 segundos después de la inoculación, transferir 1 mL de la misma, a un tubo de ensayo conteniendo 9 mL de la solución neutralizante diluida, homogenizar con un vortex y transferir por duplicado alícuotas de 1 mL a tubos de ensaye que contengan 15 mL de agar para métodos estándar a 45° C , homogenizar con vortex y vaciar a cajas de Petri



estériles permitir que solidifique, invertir las placas e incubar entre 308 K a 310 K (35° C – 37° C) durante 48 hs. Después del período de incubación contar el número de UFC en las placas.

4. Promediar los resultados de las placas de la cuenta viable inicial y de las células sobrevivientes, y calcular el % de reducción mediante la siguiente fórmula:

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

dónde:

S son las células sobrevivientes UFC/mL

C.V. es la cuenta viable inicial (promedio).

Ejemplo:

*Cuenta viable inicial:  $5.2 \times 10^9$  UFC/mL*

*Células sobrevivientes:  $2 \times 10^8$  UFC/mL*

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{2 \times 10^8 \times 100}{5.2 \times 10^9} = 96.15\%$$

5. Determinar que sanitizantes cumplen con un porcentaje de reducción de 99.999% marcada por la norma para un producto germicida.

### **6.3.7. Ensayo en superficie**

#### **6.3.7.1. Determinación de células sobrevivientes en superficie**

1. Seleccionar la superficie y únicamente limpiar con agua purificada, remover el exceso con un paño y dejar secar unos instantes. Elegir un área de 30x30 cm y marcarla con ayuda de cinta adhesiva. Realizar un muestreo con un hisopo estéril antes de limpiar y depositar en un tubo con 10 mL de solución neutralizante diluida, transferir 1 mL en un tubo de ensaye con 9 mL de caldo soya tripticaseína estéril e incubar a 48 ° C por 30 min, tomar como control positivo.

2. Aplicar el sanitizante a analizar con ayuda de un atomizador, de manera homogénea y cubriendo la totalidad de la superficie de prueba, con ayuda de un hisopo estéril tomar muestras de la superficie a los tiempos: uno, cinco y 10 minutos, depositar el hisopo con la muestra en un tubo con 10 mL de solución neutralizante diluida, transferir 1mL en un tubo de ensaye con 9 mL de caldo soya tripticaseína estéril e incubar a 48° C por 30 min. Mantener un tubo con medio estéril como control negativo, introducir un hisopo estéril únicamente.
3. Sacar de la incubación el cultivo en caldo soya tripticaseína del sanitizante en prueba y transferir 0.1 mL del caldo soya tripticaseína de cada tiempo a un tubo de ensaye con 18 mL de agar soya tripticaseína a 45° C, agitar en un vortex y vaciar a cajas de Petri estériles permitir que solidifique, invertir las placas e incubar entre 308 K a 310 K (35° C – 37° C) durante 48 hs. Tomar otra muestra del caldo soya tripticaseína de cada tiempo y sembrar con ayuda de un asa bacteriológica en placas con agar soya tripticaseína solidificado por medio de la técnica de aislamiento por estría compuesta, invertir las placas e incubar entre 308 K a 310 K (35° C – 37° C) durante 48 hs.
4. Realizar una tabla comparativa de los sanitizantes con el número de colonias sobrevivientes y determinar aquel con el número más bajo.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

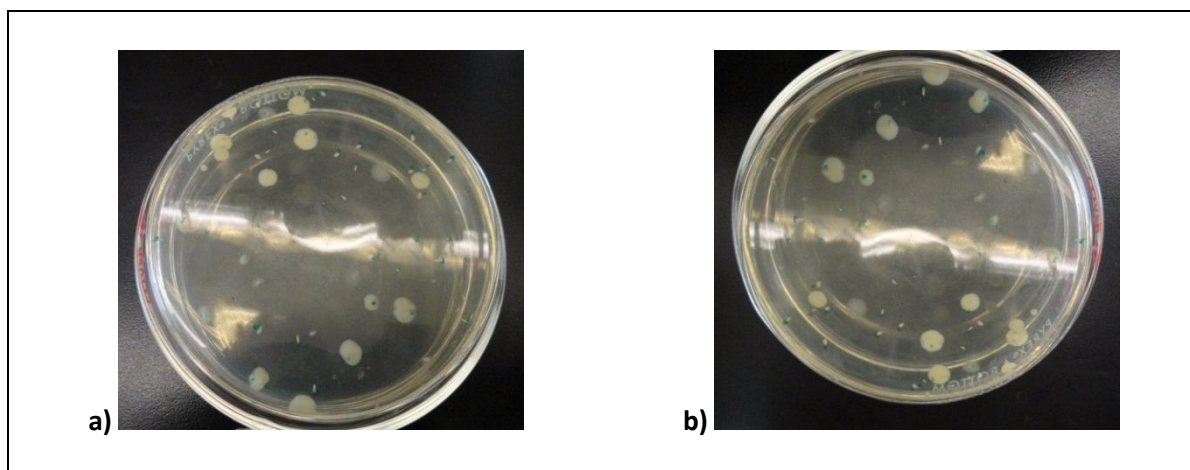
### 7.1. Determinación de células sobrevivientes NMX-BB-040-SCFI-1999'

#### 7.1.1. *Escherichia coli* ATCC 11229

Para la determinación del porcentaje de reducción, se determinó la cuenta viable inicial de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 11229 a partir de una suspensión que leída a 580 nm dio una lectura de 4% de transmitancia. En el *cuadro 7.1* se encuentran las colonias en placa a diferentes diluciones, aquellas que fueron menor a  $10^{-6}$  presentaron incontables colonias, mientras que con las posteriores, se obtuvieron entre 40 y 57 colonias, por lo cual se eligió la dilución  $10^{-8}$  al estar en el rango intermedio de las colonias requeridas que es de 25 a 250 con un promedio de 48 colonias para inocular las muestra de sanitizantes y determinar las células sobrevivientes.

**Cuadro 7.1. Cuenta inicial *Escherichia coli* 11229**

Dilución realizada	No. de colonias en placa
$10^{-10}$	1
$10^{-10}$	1
$10^{-8}$	57
$10^{-8}$	40
$10^{-6}$	Más de 300
$10^{-6}$	Más de 300
$10^{-2}$ a $10^{-4}$	Incontables



**Figura 1.1** Placas de dilución  $10^{-8}$  para la determinación de cuenta viable inicial con la cepa de *Escherichia coli* 11229: **a)** Placa No.1 con  $4 \times 10^9$  UFC /mL, **b)** Placa No. 2 con  $5.7 \times 10^9$  UFC /mL.

En la determinación de las células sobrevivientes de *Escherichia coli* 11229 al estar en contacto con las diferentes muestras de sanitizantes durante 30 segundos, se obtuvieron los resultados que se muestran en el *cuadro 7.2*. Los sanitizantes hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio, no presentaron ningún crecimiento de colonias, obteniendo de esta forma un porcentaje de reducción del 100%, sin embargo el sanitizante etanol solo presento una actividad antimicrobiana del 98.95%.

**Cuadro 7.2** Determinación de las células sobrevivientes de *Escherichia coli* 11229

Sanitizante utilizado	No. de colonias en placa	Porcentaje de reducción	Promedio de porcentaje de reducción
Etanol	0	100	98.95
	1	97.91	
Hipoclorito de sodio	0	100	100
	0	100	
Cloruro de benzalconio	0	100	100
	0	100	

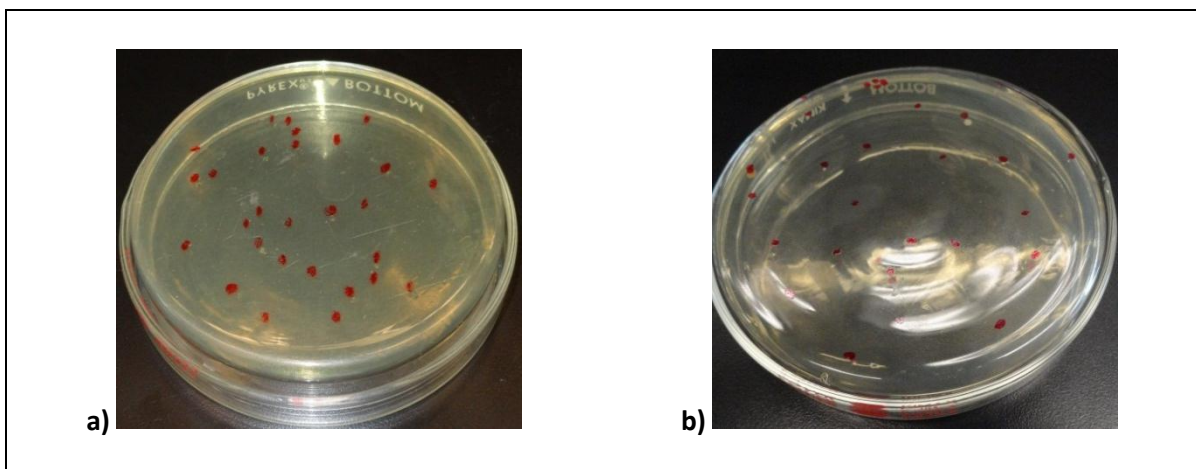
En cinco de las seis placas no se observó la presencia de colonias, la placa No.2 de etanol si presento crecimiento (*anexo III*), por lo tanto el hipoclorito de sodio (1000 ppm) y cloruro de benzalconio (1%) son más efectivos al eliminar en un 100% la bacteria de *Escherichia coli* 11229, en comparación con el etanol (70%).

### 7.1.2. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Los siguientes resultados son de la cuenta viable inicial de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 partiendo de una suspensión que al leerla en espectrofotómetro a 580 nm se obtuvo una lectura de 4.5% de transmitancia. En el *cuadro 8.1* se muestran las colonias observadas a diferentes diluciones, aquellas que fueron menor a  $10^{-6}$  presentaron incontables colonias, mientras que con las posteriores, se obtuvieron entre 32 y 28 colonias, por lo cual se eligió la dilución  $10^{-8}$  al estar en el rango intermedio de las colonias requeridas que es de 25 a 250 con un promedio de 30 colonias, para inocular las muestra de sanitizantes y determinar las células sobrevivientes.

**Cuadro 8.1.** Cuenta inicial *Staphylococcus aureus* 6538

Dilución realizada	No. de colonias en placa
$10^{-10}$	1
$10^{-10}$	0
$10^{-8}$	28
$10^{-8}$	32
$10^{-6}$	Más de 300
$10^{-6}$	Más de 300
$10^{-2}$ a $10^{-4}$	Incontables



**Figura 2.1** Placas de dilución  $10^{-8}$  para la determinación de cuenta viable inicial con la cepa de *Staphylococcus aureus* 6538: **a)** Placa No.1 con  $3.2 \times 10^9$  UFC /mL, **b)** Placa No. 2 con  $2.8 \times 10^9$  UFC /mL.

Los resultados de la determinación de las células sobrevivientes de *Staphylococcus aureus* 6538 e muestran en el *cuadro 8.2*. Los sanitizantes hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio, no presentaron ningún crecimiento de colonias, obteniendo de esta forma un porcentaje de reducción del 100%, sin embargo con el sanitizante etanol al 70% no sucedió lo mismo ya que presentó una actividad antimicrobiana del 98.95%.

**Cuadro 8.2** Determinación de las células sobrevivientes de *Staphylococcus aureus* 6538

Sanitizante utilizado	No. de colonias en placa	Porcentaje de reducción	Promedio de porcentaje de reducción
Etanol	0	100	98.95
	1	97.91	
Hipoclorito de sodio	0	100	100
	0	100	
Cloruro de benzalconio	0	100	100
	0	100	

En cinco de las seis placas no se observó la presencia de colonias solo la placa No.2 de etanol si presentó crecimiento (*anexo IV*), nuevamente como ocurrió también con la cepa de *Escherichia coli* 11229, el etanol no cumplió con el 99.999% de reducción requerido por la norma.

### 7.1.3. Dictamen de la norma

Los resultados de la actividad antimicrobiana utilizando las cepas de *Escherichia coli* ATCC 11229 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, se muestran en el cuadro 9.

**Cuadro 9.** Resultados de la prueba de Actividad antimicrobiana de los sanitizantes evaluados de acuerdo a la norma NMX-BB-040-SCFI-1999

Sanitizante evaluado	Porcentaje de reducción con la cepa		Dictamen
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	
Hipoclorito de sodio	100	100	Cumple
Cloruro de benzalconio	100	100	Cumple
Etanol	98.95	98.95	No cumple

El sanitizante etanol no tiene un porcentaje de reducción del 99.999% al estar 30 segundos con los microorganismos de prueba, por lo tanto no cumple con la norma NMX-BB-040-SCFI-1999 para productos germicidas. Esto se debe posiblemente a que el tiempo de acción del etanol para los microorganismos utilizados es mayor al tiempo requerido por la norma que es de solo 30 segundos debido a que la concentración no era la estipulada en el marbete. En el estudio realizado por *Gonzales B. y López F. (2011)*<sup>29</sup> en geles antibacteriales con etanol al 70% y usando las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC O111 muestran un porcentaje de reducción del 99.999% a los 30 segundos de contacto en algunos geles, por lo que la concentración pudiera ser un factor para estos resultados, ya que la bibliografía marca una concentración de 70% para poder realizar una acción eficaz.<sup>9</sup> Por otro lado los sanitizantes hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio presentaron un porcentaje de reducción del 100% por lo que su uso es confiable para una disminución del 99.999% de los microorganismos existentes a los 30 segundos de contacto.

Estos resultados también muestran que el hipoclorito de sodio a una concentración de 1000 ppm y el cloruro de benzalconio a una concentración de 1:100 son buenos candidatos para la desinfección de material de laboratorio como puede ser el material de vidrio, acero inoxidable u otro, siempre y cuando el material no sea susceptible a estas sustancias.

## 7.2. Ensayo en superficie

Se realizaron muestreos en áreas de 30x30 cm y se contó el número de microorganismos que sobrevivieron después de aplicar los sanitizantes en dichas superficies en tres diferentes tiempos para observar el tiempo óptimo de sanitización. Para este ensayo se aplicaron las mismas condiciones para los tres sanitizantes, es decir; se tenía la misma temperatura ambiente, los mismos tiempos de contacto y la misma biocarga ya que se realizó sobre la misma superficie pero en diferentes áreas, a una distancia que evitara una interacción cruzada de los sanitizantes.

En el *cuadro 10.1* se observa los resultados obtenidos del vaciado en placa y del aislamiento por estría compuesta, haciendo notar que existe poco crecimiento en las placas de los tres sanitizantes. Las placas se muestran en el *anexo V*.

**Cuadro 10.1.** Resultados del ensayo en superficie de los sanitizantes (número de colonias)

Tiempo	Sanitizantes					
	Hipoclorito de sodio		Cloruro de benzalconio		Etanol *	
	Vaciado	Estría	Vaciado	Estría	Vaciado	Estría
1 minuto	0	0	0	2	2	0
5 minutos	1	1	0	0	0	2
10 minutos	0	0	0	1	0	1

\*No cumplió con una eliminación del 99.999% a los 30 seg.

En el *cuadro 10.1* se aprecia que aquellos sanitizantes que cumplieron con la norma mexicana, en este caso el hipoclorito de sodio y el cloruro de benzalconio tiene un número de colonias menor en comparación con el sanitizante que no cumplió con la norma. En investigaciones realizadas por *Acosta G. et al (2001)*<sup>33</sup> muestran que el cloruro de benzalconio comercializado en México no tiene un efecto esporicida demostrable para la esterilización de material quirúrgico y se recomienda el uso en superficies, los resultados obtenidos en esta investigación manifiestan que tiene un efecto bactericida aceptable sobre superficies.



**Cuadro 10.2** Resultados de las placas control

Placa	control	
	positivo	negativo
Vaciado en placa	crecimiento	Sin crecimiento
Estría compuesta	crecimiento	Sin crecimiento

Las placas control positivas (*cuadro 10.2*) mostraron un crecimiento con un número incontable de colonias, la muestra de estas placas fue tomada antes de realizar la sanitización del área por lo tanto es evidente que la carga bacteriana sea muy alta, mientras que en la placa control negativa no se observó ningún crecimiento.

El propósito de realizar las pruebas en superficies fue para retar directamente al desinfectante y comprobar su efectividad *in situ*, por lo que quedó demostrado ya que el bajo índice de colonias demuestra que ciertamente tiene un poder antimicrobiano capaz de eliminar la mayor carga bacteriana bajo condiciones a las que será sometido.

### 7.2.1. Evaluación de resultados

Al comparar la actividad antimicrobiana en superficie, se observó que el sanitizante que elimino más biocarga fue el hipoclorito de sodio (1000 ppm) al tener solo dos colonias totales en comparación de las tres y cinco colonias del cloruro de benzalconio (al 1%) y etanol (al 70%) respectivamente (*cuadro 12*).

**Cuadro 12.** Resultados del ensayo en superficie de los sanitizantes (número de colonias totales)

Tiempo	Sanitizantes		
	Hipoclorito de sodio	Cloruro de benzalconio	Etanol *
1 minuto	0	2	2
5 minutos	2	0	2
10 minutos	0	1	1
Colonias Totales	2	3	5

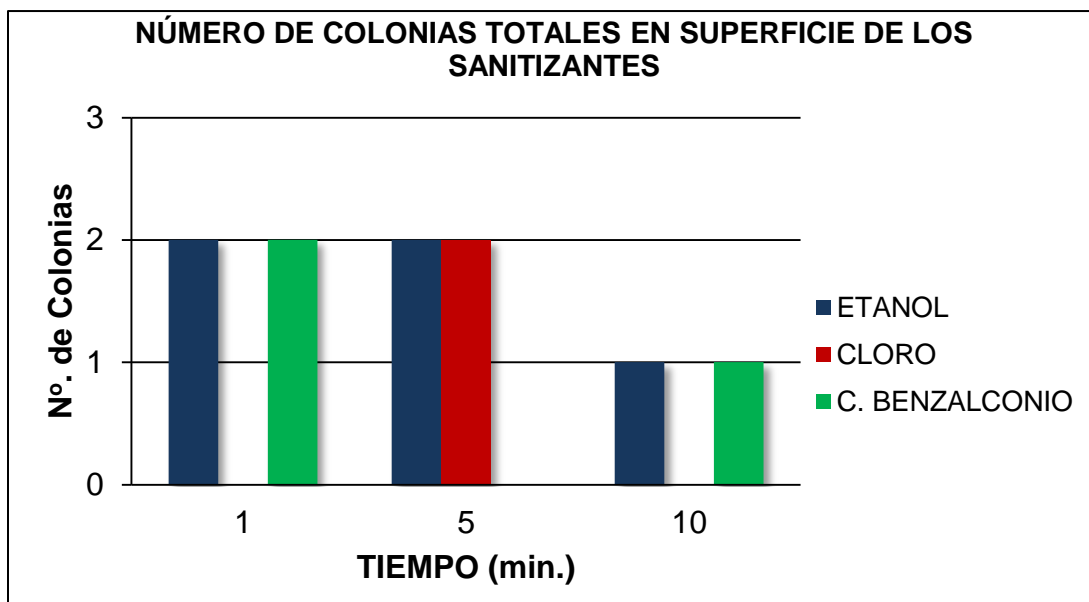
\*No cumplió con una eliminación del 99.99% a los 30 seg.

Puesto que la concentración del hipoclorito de sodio usada en esta prueba fue de 1000 ppm y se tienen buenos resultados, podemos esperar que a concentraciones superiores se tenga un mejor efecto como se demuestra en el estudio realizado por *Sassone L. et al (2007)*<sup>34</sup> donde se evaluó la capacidad antimicrobiana del hipoclorito de sodio a 1% y 5% en diferentes muestras bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*) demostrando una eficacia comprobada en las concentraciones utilizadas.

Posiblemente un factor que afecta que el etanol sea el sanitizante con menor eficacia en el ensayo en superficie se deba a su volatilidad como disolvente, ya que afecta el tiempo de contacto para realizar su acción, ya que una vez aplicado este se volatiliza de las superficies más rápido que los otros sanitizantes (también podría ser una ventaja) y por tanto evita que este más tiempo en contacto con la superficie impidiendo que elimine eficazmente la biocarga, es necesario entonces aplicar constantemente el sanitizante para tener un mejor efecto.

Así mismo el tiempo óptimo de eliminación fue alrededor de los diez minutos, ya que en este periodo los sanitizantes obtuvieron el número más bajo de crecimiento de microorganismos como se observa en el *gráfico 1*.

**Gráfico 1.** Resultados del ensayo en superficie de los sanitizantes (número de colonias totales)



Se estableció un procedimiento con base en la norma NOM–BB-040-SCFI-1999 para los desinfectantes; el cual es reproducible para cualquier sustancia que posee actividad germicida. El porcentaje de reducción de las células sobrevivientes del etanol es menor al requerido por la norma, no así para los sanitizantes hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio donde se cumplió satisfactoriamente. Con un ensayo realizado en superficies se encontró al hipoclorito de sodio con mejores resultados en comparación con el cloruro de benzalconio y el etanol, al eliminar mayor biocarga, además que el tiempo óptimo es alrededor de los diez minutos desde su aplicación y dado que su costo<sup>a</sup> es el más bajo de entre los sanitizantes utilizados lo hace idóneo en la sanitización de los laboratorios en general, y también en la desinfección de material que no sea susceptible.

<sup>a</sup> costo aproximado por 1L. de: cloro \$4 a \$9  
 etanol \$39 a \$43  
 cloruro de benzalconio \$10 a \$13.50

## 8. CONCLUSIONES

- Se estableció un procedimiento con base en la norma NMX-BB-040-SCFI-1999, que permite evaluar la efectividad de diversos sanitizantes usados en superficies.
- En cuanto a la determinación del porcentaje de reducción de microorganismo en las células sobrevivientes se encontró que el hipoclorito de sodio y el cloruro de benzalconio cumplen satisfactoriamente al eliminar el 99.999% de los microorganismos de prueba pero no así el etanol al tener sólo un 98.95% de eliminación.
- Con respecto a la actividad antimicrobiana en superficies se obtuvo que el tiempo de acción óptimo es alrededor de los 10 minutos para los tres sanitizantes, sin embargo el sanitizante con mayor eliminación de biocarga presente en la superficie de prueba fue el hipoclorito de sodio.
- Al evaluar los sanitizantes usados en los laboratorios de MG II y laboratorio I PA de la UMIEZ de la FES Zaragoza el hipoclorito de sodio con una concentración de 1000 ppm cumple con la norma NMX-BB-040-SCFI-1999, además aplicado en superficies es el que tiene mayor efectividad tanto en tiempo de contacto y en número de biocarga eliminada, por tanto es el sanitizante idóneo para la sanitización de los laboratorios por el costo/beneficio.

## 9. SUGERENCIAS

- Realizar estudios para determinar tiempos de rotación entre los sanitizantes que cumplen con la norma, para evitar que los microorganismos desarrollen resistencia a ellos.
- Se propone una guía de limpieza para superficies (*anexo VI*), para aprovechar de manera efectiva el uso de los sanitizantes en los laboratorios de Microbiología General II y laboratorio I de la UMIEZ.

## 10. REFERENCIAS

1. Comisión Interinstitucional de Buenas Prácticas de Fabricación, *Procesos de Limpieza y su Validación en Áreas de Fabricación*. México: CIPAM, 1999
2. Vellutato A. *Utilizing Environmental Monitoring data to implement a Cleaning and Disinfection Program*, México: enFarma; 2009
3. Gonzales M. *Diseño e implementación del programa de control microbiológico en el área de microbiología de un laboratorio farmacéutico* [Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo] México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México. FES Zaragoza; 2011.
4. Gobierno Federal de México. *Desinfección*. [Base de datos en Internet]. Diario Oficial de la Federación. [Consultado el 30 de enero de 2012]. Disponible en <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/capitulo9.html>.
5. Gobierno Federal de México. NOM-059-SSA1-2006, *Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos*. [Base de datos en Internet]. Diario Oficial de la Federación. [Consultado el 30 de enero de 2012]. Disponible en [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5075307&fecha=22/12/2008](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5075307&fecha=22/12/2008)
6. Esteripharma. *Sanitización de alto nivel*. [Artículo en internet] Esteripharma México S.A de C.V [Consultado el 25 de mayo de 2012]. Disponible en [http://www.esteripharma.com/Pdf\\_View.php?Concepto=20&Archivo=sanitizacion%20de%20alto%20nivel.pdf](http://www.esteripharma.com/Pdf_View.php?Concepto=20&Archivo=sanitizacion%20de%20alto%20nivel.pdf).
7. Ayres J.C., Mundt J.O., Sandine W.E. *Microbiology of Foods*. United States American: WH Freeman & Co. 1980
8. Secretaria Distrital de Salud de Bogotá. *Guías para la prevención, control y vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias: Uso de Desinfectantes*. [libro en internet] Secretaria de salud. Bogotá: Esfera Editores Ltda; 2004. Disponible en <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Todo%20IH/007%20Desinfectantes.pdf>
9. Jimenez L. Swarbrick J. *Microbial Contamination Control in the pharmaceutical Industry*. U.S.A: Marcel Dekker; 2004
10. Wolfgang K., Phil D., Hilda P. et. al, *Microbiología*. 20a ed. Argentina: Panamericana; 1998
11. Ingraham J., Ingraham C. *Introducción a la microbiología*. España: Reverté S.A. 1998
12. Stephen P., Denyer S., Rosamund M. *Guide to microbiological control in pharmaceutical and medical devices*. United States American: CRC Press; 2007

13. Blook S. *Desinfection, sterilization and preservation*. 4a ed. United States American: Lea & Fegiber; 1994
14. Gobierno Federal de México. NMX-BB-040-SCFI-1999 [Base de datos en Internet]. Diario Oficial de la Federación. [Consultado el 29 de enero de 2012]. Disponible en <http://200.77.231.100/work/normas/nmx/1999/nmx-bb-040-scfi-1999.pdf>.
15. Romero C. *Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. 3a ed. México: Medica Panamericana; 2007
16. Quentin N., Russell S. *Bacteriología y micología médicas*. 2a ed. México: Interamericana; 1991
17. Kenneth J. Sherris, *Microbiología Médica*. 4a ed. México: Mac Graw Hill; 2007
18. Peña N. *Investigación hemerobibliográfica de aspectos más recientes de la producción de diarrea por los diferentes patotipos de Escherichia coli en México, haciendo énfasis en ETEC y EHEC* [Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo] México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México. FES Zaragoza; 2006.
19. Sandoval M. *Escherichia coli y sus serotipos enteropatogenos* [Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo] México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México. FES Zaragoza; 2000.
20. Brooks F., Butel J., Morse S. *et al Microbiología médica*. 14a ed. México: El manual moderno; 1992
21. Delaat A. *Microbiología*. 2a ed. México: Interamericana; 1983
22. Madigan M., Martinko J., Parker J. Brock: *Biología de los microorganismos*. 10a ed. España: Pearson-Prentice hall; 2003
23. Prescott L., Harley J., Klein D. *Microbiology*. 5a ed. United States American: McGraw-Hill; 2002
24. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 9a ed. México: Secretaria de salud; 2008
25. Rowe C, Sheskey P, Owen C. *Handbook of pharmaceutical Excipients*. 5a ed. United States American: Pharmaceutical Press; 2006
26. Moffat A., Osselton D., Widdop B. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 3a ed. United States American: Pharmaceutical Press; 2004
27. Cowan M., Park T. *Microbiology a Systems Approach*. United States American: McGraw-Hill; 2006
28. Organización Mundial de Salud, *Manual de bioseguridad en el laboratorio*. [libro en internet]. 3a ed. Ginebra; 2005 [Consultado el 4 de febrero 2012]. Disponible en [http://www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/lab-biosafety\\_omsspa.pdf](http://www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/lab-biosafety_omsspa.pdf).

29. Gonzales B., López F. *Evaluación de la actividad antimicrobiana de diferentes marcas de gel de alcohol etílico comparadas con una de referencia del Instituto Nacional de Pediatría* [Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo] México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México. FES Zaragoza; 2011.
30. Meza F. *Desinfectantes químicos*. [boletín técnico en internet]. Provinas S.A de C.V [Consultado el 27 de enero de 2012]. Disponible en [http://www.provinas.net/files/boletin\\_tecnico\\_002.pdf](http://www.provinas.net/files/boletin_tecnico_002.pdf).
31. Burrows W., Freeman B. *Tratado de microbiología*. 20a ed. México: Interamericana; 1987
32. Sánchez S., Sáenz A. *Antisépticos y desinfectantes*. [Revista en internet]. Dermatología Peruana. Vol. 15 N.2; 2005 [consultada el 9 de abril de 2012]. Disponible en [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v15\\_n2/pdf/a02.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v15_n2/pdf/a02.pdf)
33. Acosta G., Herrero A., Mata V. *El cloruro de benzalconio: inaceptable para esterilizar o desinfectar instrumental médico*. [artículo en internet]. Salud Publica Mex; 2001 [consultada el 27 de Noviembre de 2012]. Disponible en <http://www.insp.mx/salud/index.html>.
34. Sassone L. et al *Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests* [artículo en internet]. Department of Endodontics, Brazil. 2007. [consultada el 27 de Noviembre de 2012]. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18352899>
35. MCD LAB. *Agar Nutritivo*. [Guía técnica en internet] MCD LAB S.A. de C.V. México. [Consultado el 6 de febrero de 2012] Disponible en <http://www.mcd.com.mx/pdfs/AGAR%20NUTRITIVO.pdf>.
36. MCD LAB. *Agar Soya tripticaseína*. [Guía técnica en internet] MCD LAB S.A. de C.V. México. [Consultado el 6 de febrero de 2012] Disponible en <http://www.mcd.com.mx/pdfs/AGAR%20SOYA%20TRIPTICASEINA.pdf>. MCD LAB.
37. *Agar métodos estándar*. [Guía técnica en internet] MCD LAB S.A. de C.V. México. [Consultado el 6 de febrero de 2012] Disponible en <http://www.mcd.com.mx/pdfs/AGAR%20METODO%20ESTANDAR.pdf>.
38. Nefelobac. *Escala nefelométrica de Mc Farland*. [Artículo en n línea] Probac S.A de C.V Brasil. [Consultado el 6 de febrero de 2012]. Disponible en <http://www.probac.com.br/bulas/nefelobac.pdf>.



## GLOSARIO<sup>5, 6,10, 11</sup>

**Actividad antimicrobiana:** Propiedad que tiene una sustancia de inhibir o matar a los microorganismos

**Bactericida:** Antimicrobiano que no sólo inhibe el crecimiento, sino que destruye las bacterias.

**Biocarga:** es el número y tipo de microorganismos con los que un objeto está contaminado.

**Biocida:** agente químico que mata todos los microorganismos vivos, incluidas las endosporas bacterianas. Este término es sinónimo de esporocida.

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

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

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

**Desinfección:** Es la eliminación de microorganismos infecciosos en objetos inanimados o la reducción de los mismos a niveles que no constituyan un peligro para la salud pública, en el sector farmacéutico el término se aplica a los procesos que proporcionan una reducción de 5-log en el contenido microbiano.

**Desinfectante:** Es un producto que destruye o elimina microorganismos en superficies inanimadas.

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

**Sanitizante:** Agente que reduce o elimina en superficies inanimadas, bacterias, hongos y algunos virus.<sup>26</sup>

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

## **ANEXO I PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS**

### **Agar nutritivo (1 L)<sup>35</sup>**

- Peptona de Gelatina 5.0 g
- Extracto de Carne 3.0 g
- Agar bacteriológico 15.0 g
- pH  $6.8 \pm 0.2$

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

### **Agar Soya-tripticaseína (1 L)<sup>36</sup>**

- Peptona de Caseína 15.0
- Peptona de Soya 5.0
- Cloruro de Sodio 5.0
- Agar Bacteriológico 15.0
- pH  $7.3 \pm 0.2$

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

### **Caldo soya-tripticaseína (1 L)<sup>36</sup>**

- Peptona de Caseína 17.0
- Peptona de Soya 3.0
- Cloruro de Sodio 5.0
- Fosfato Dipotásico 2.5
- Ph  $7.3 \pm 0.2$

Preparación: Suspender 30 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Verter en los recipientes o tubos requeridos y esterilizar en autoclave  $121^{\circ}$  C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

### **Solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M (1 L)<sup>14</sup>**

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

Preparación: En un matraz volumétrico de 1 000 mL, disolver 34 g de fosfato monobásico de potasio en 500 mL de agua, ajustar el pH entre 7.1 y 7.3 con la solución de hidróxido de sodio, aforar con agua, mezclar. Esterilizar en autoclave a 394 K (121° C) durante 15 min., dejar enfriar y conservar en refrigeración.

### **Solución amortiguadora de fosfatos diluida (1 L)<sup>14</sup>**

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M
- Agua destilada

Preparación: Colocar 1.25 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M en un matraz volumétrico de 1 L y llevar a volumen con agua, mezclar y distribuir en porciones de 9 mL en tubos y/o matraces y esterilizar en autoclave a 394 K (121° C) durante 15 min.

### **Hidróxido de sodio 1.0 N (1 L)**

- NaOH 40 g en 1000 mL

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

### **Agar para métodos estándar (1 L)<sup>37</sup>**

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

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

### **Solución neutralizante concentrada (1 L)<sup>14</sup>**

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

Preparación: Mezclar 40 g de azolecitina, con 280 mL de polisorbato 80 y 1.25 mL de la solución amortiguadora de fosfatos, diluir con agua hasta obtener un volumen final de un 1 L; ajustar el pH a 7.2 con la solución volumétrica de hidróxido de sodio o la solución volumétrica de ácido clorhídrico. Esterilizar en autoclave a 394 K (121° C) durante 20 min.

### **Solución neutralizante diluida (2 L)<sup>14</sup>**

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

Preparación: Mezclar 100 mL de la solución neutralizante concentrada con 25 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 0,25 M, adicionar 1 675 mL de agua, mezclar y distribuir en porciones de 9 mL en tubos con rosca de 20 mm x 150 mm. Esterilizar en autoclave a 394 K (121°C) durante 20 min.

### **Ácido clorhídrico 1.0N (1 L)**

- HCl 36.46 g en 1000 mL.

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

## ANEXO II ESCALA DE Mc FARLAND

La escala nefelométrica de turbidez McFarland es usada para determinar la intensidad de proliferación de bacterias en medios de cultivo, esta multiplicación en medios líquidos se manifiesta por un aumento de partículas (bacterias) que se oponen al libre paso de la luz, causando turbidez o la opacidad en el centro. Cuanto mayor sea el número de bacterias, mayor es la opacidad del medio.<sup>34</sup>

La finalidad, es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana y por espectrofotometría se crea una recta patrón, de forma que se pueda detectar la concentración de las diluciones bacterianas (de manera aproximada, ya que depende de factores como el tamaño de la bacteria, la formación de agregados).

Se trata de una serie numerada de 10 tubos, la escala se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico. Con diferentes cantidades de cloruro de bario y ácido sulfúrico se obtienen diferentes concentraciones de sulfato de bario, que corresponden a diferentes recuentos bacterianos. La equivalencia de UFC/mL se muestra en el siguiente cuadro.

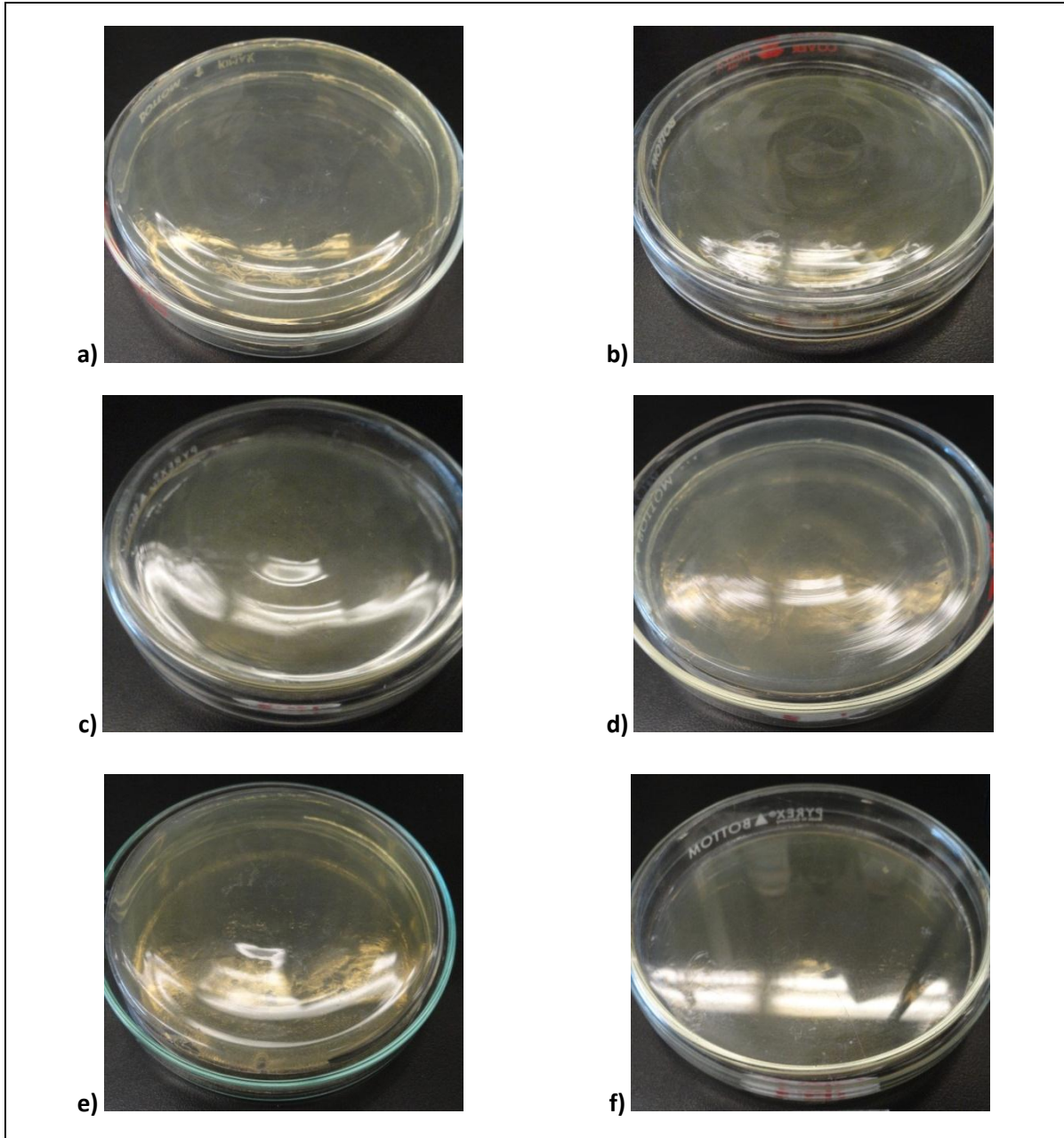
*Escala de Mc Farland*

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

Procedimiento: Comparar los tubos a simple vista con el tubo de bacterias, antes agitar los tubos vigorosamente debido a que el sulfato de bario tiende a precipitar. También homogenizar el tubo con el cultivo bacteriano, para tener una suspensión (aspecto turbio) uniforme.<sup>38</sup>

### ANEXO III Placas de los sanitizantes evaluados con la cepa *Escherichia coli* 11229

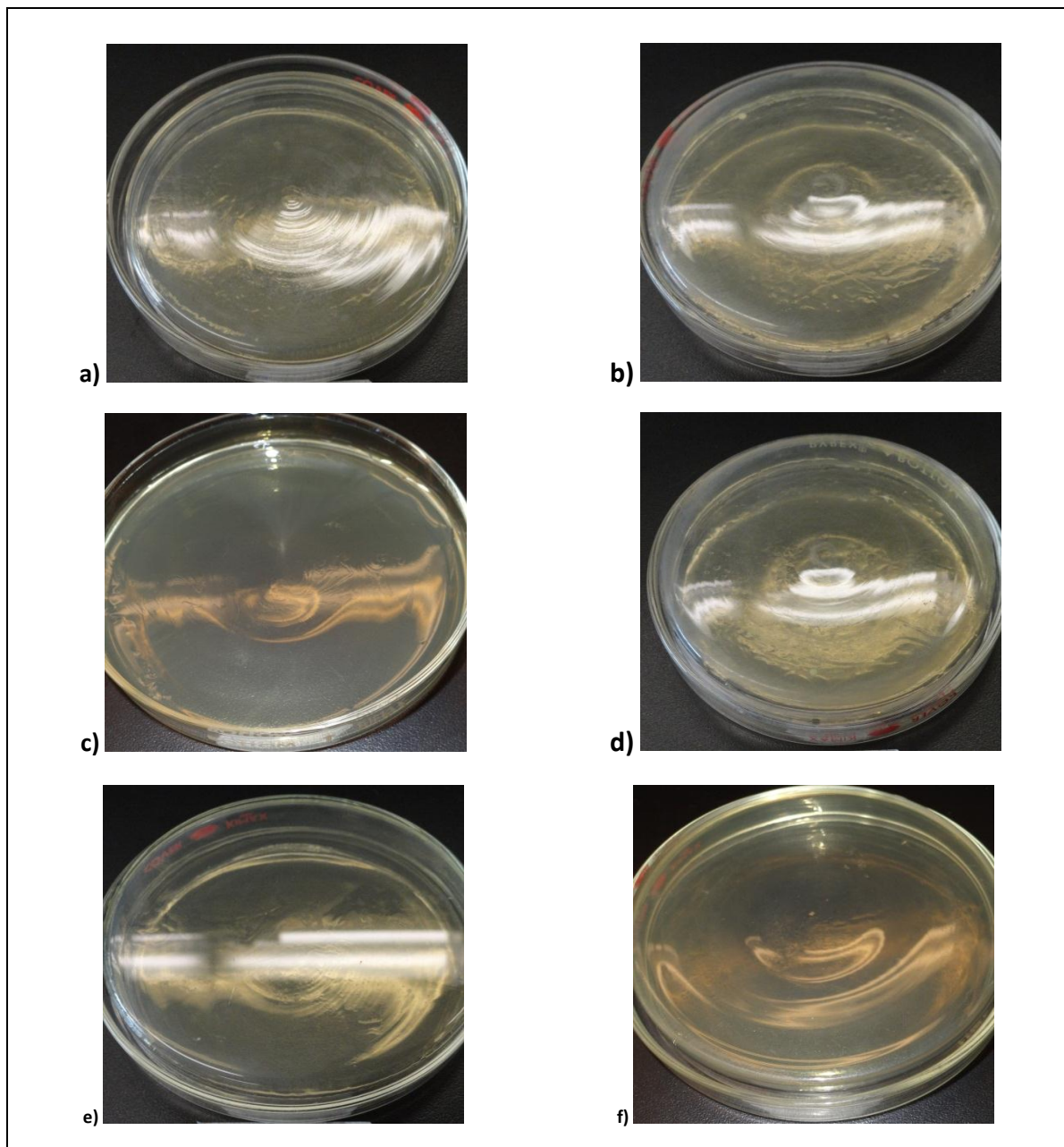
A continuación se muestran las placas de los sanitizantes que se evaluaron con la cepa de *Escherichia coli* 11229 para la determinación de células sobrevivientes.



**Figura 1.2.** Placas de los sanitizantes que se evaluaron con la cepa de *Escherichia coli* 11229 para la determinación de las células sobrevivientes: **a)** Etanol placa No.1 sin crecimiento, **b)** Etanol placa No.2 con crecimiento, **c)** Hipoclorito de sodio placa No.1 sin crecimiento, **d)** Hipoclorito de sodio placa No.2 sin crecimiento, **e)** Cloruro de Benzalconio placa No.1 sin crecimiento, **f)** Cloruro de Benzalconio placa No.2 sin crecimiento.

#### ANEXO IV Placas de los sanitizantes evaluados cepa de *Staphylococcus aureus* 6538

A continuación se muestran las placas de los sanitizantes que se evaluaron con la cepa de *Staphylococcus aureus* 6538 para la determinación de células sobrevivientes.



**Figura 2.2.** Placas de los sanitizantes que se evaluaron con la cepa de *Staphylococcus aureus* 6538 para la determinación de las células sobrevivientes: **a)** Etanol placa No.1 sin crecimiento, **b)** Etanol placa No.2 con crecimiento, **c)** Hipoclorito de sodio placa No.1 sin crecimiento, **d)** Hipoclorito de sodio placa No.2 sin crecimiento, **e)** Cloruro de Benzalconio placa No.1 sin crecimiento, **f)** Cloruro de Benzalconio placa No.2 sin crecimiento.

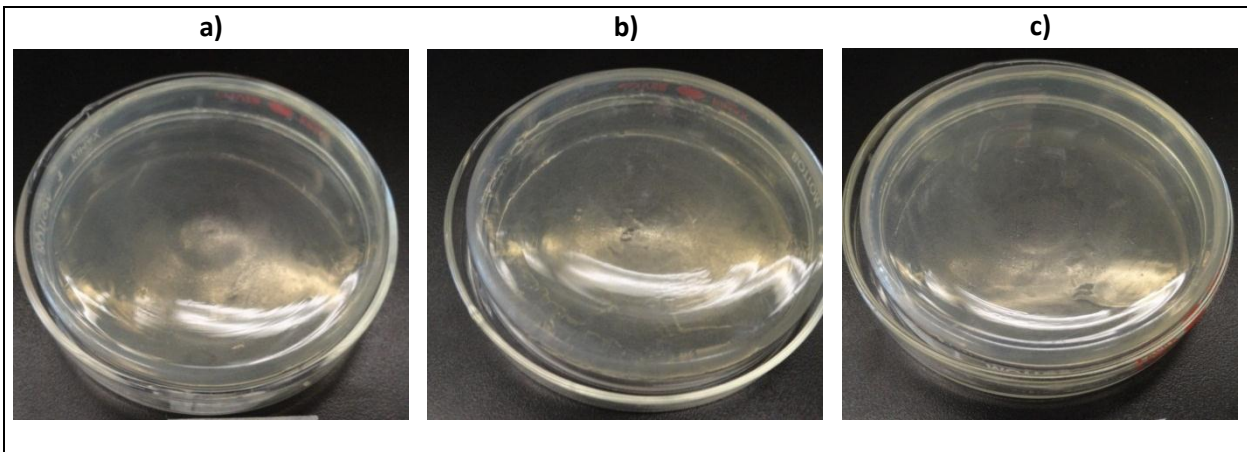


## ANEXO V Ensayo en superficie

A continuación se muestran las placas de los sanitizantes que se evaluaron al minuto, cinco minutos y 10 minutos para el ensayo en superficie.

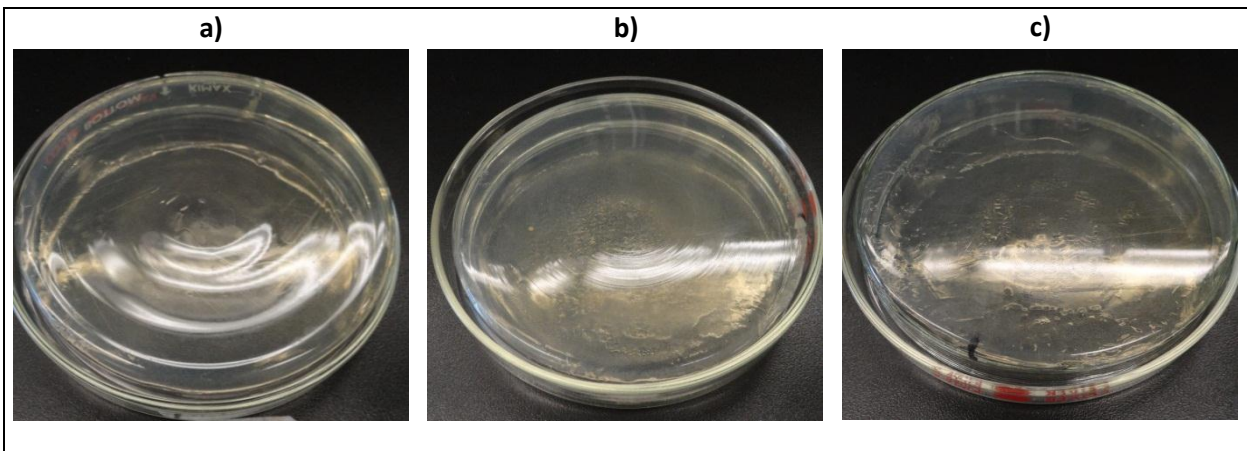
### Placas con el sanitizante hipoclorito de sodio

#### Vaciado en placa



**Figura 3.1.** Placas con el sanitizante hipoclorito de sodio que se evaluó al minuto, cinco minutos y 10 minutos del ensayo en superficie: **a)** placa al 1° minuto sin crecimiento, **b)** placa a los cinco minutos con crecimiento, **c)** placa a los 10 minutos sin crecimiento.

#### Aislamiento por estría

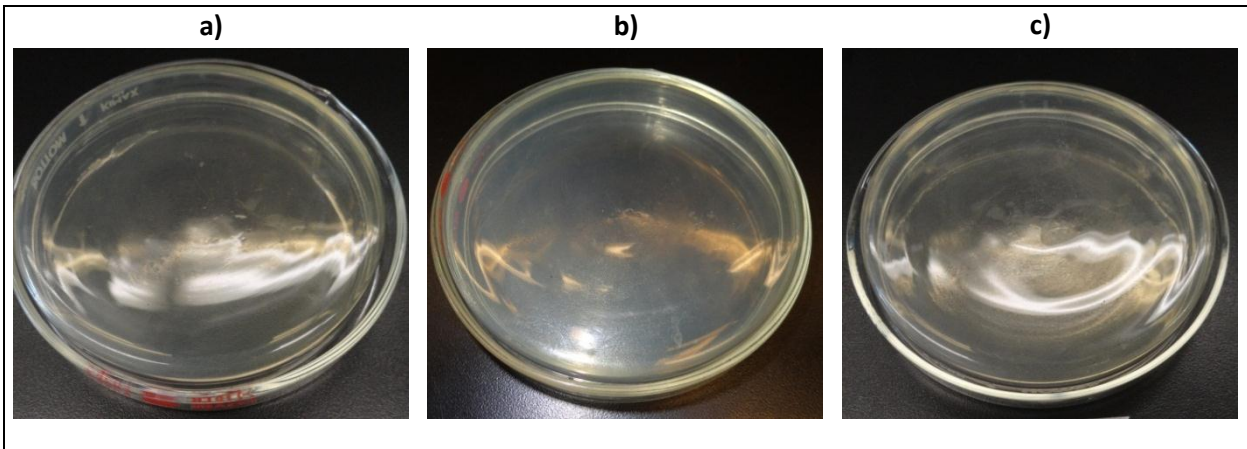


**Figura 3.1.** Placas con el sanitizante hipoclorito de sodio que se evaluó al minuto, cinco minutos y 10 minutos del ensayo en superficie: **a)** placa al 1° minuto sin crecimiento, **b)** placa a los cinco minutos con crecimiento, **c)** placa a los 10 minutos sin crecimiento.



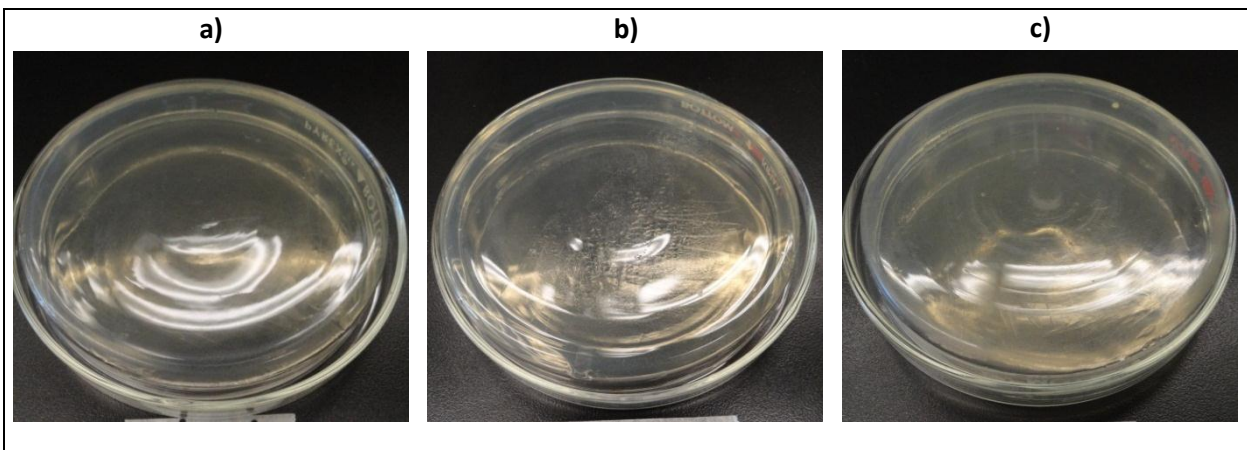
## Placas con el sanitizante etanol

### Vaciado en placa



**Figura 4.1.** Placas con el sanitizante etanol que se evaluó al minuto, cinco minutos y 10 minutos del ensayo en superficie: **a)** placa al 1° minuto con crecimiento, **b)** placa a los cinco minutos sin crecimiento, **c)** placa a los 10 minutos sin crecimiento.

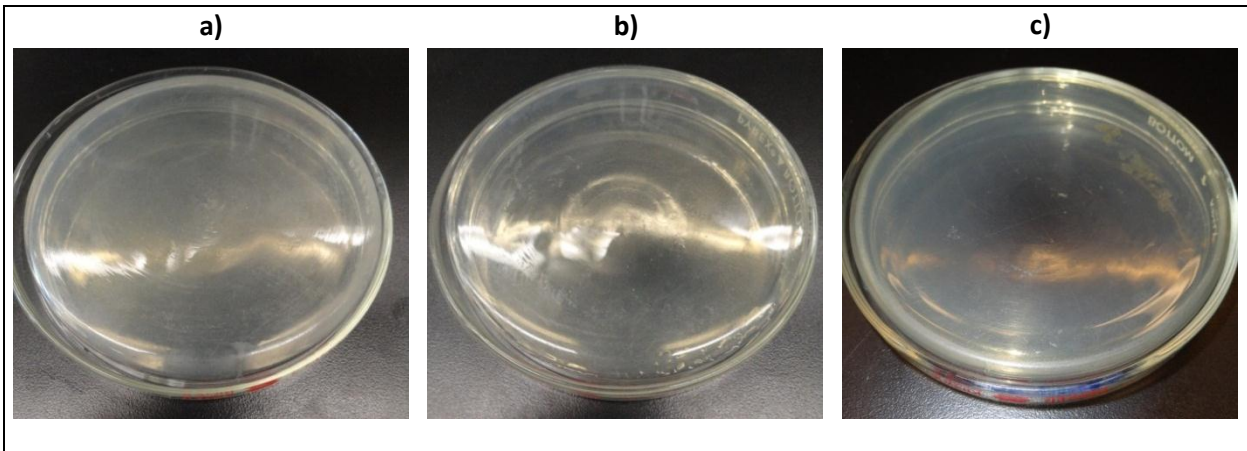
### Aislamiento por estría



**Figura 4.2.** Placas con el sanitizante etanol que se evaluó al minuto, cinco minutos y 10 minutos del ensayo en superficie: **a)** placa al 1° minuto sin crecimiento, **b)** placa a los cinco minutos con crecimiento, **c)** placa a los 10 minutos con crecimiento.

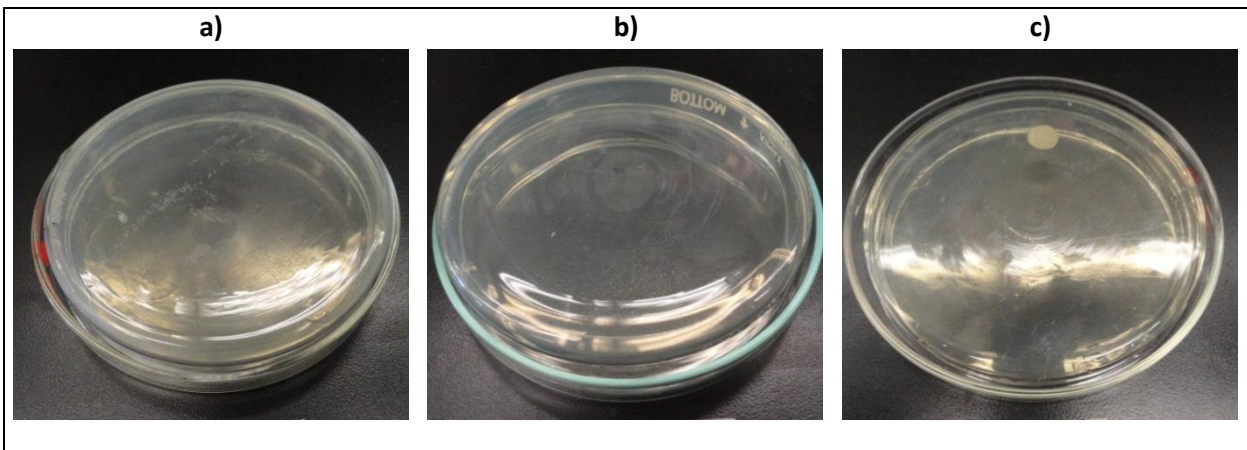
## Placas con el sanitizante cloruro de benzalconio

### Vaciado en placa



**Figura 5.1** Placas con el sanitizante cloruro de benzalconio que se evaluó al minuto, cinco minutos y 10 minutos del ensayo en superficie: **a)** placa al 1° minuto sin crecimiento, **b)** placa a los cinco minutos sin crecimiento, **c)** placa a los 10 minutos sin crecimiento.

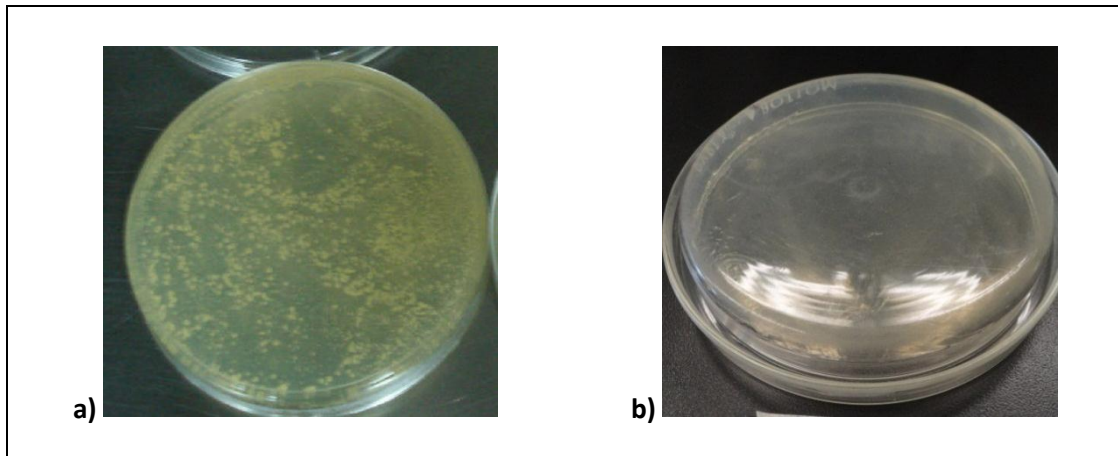
### Aislamiento por estría



**Figura 5.2** Placas con el sanitizante cloruro de benzalconio que se evaluó al minuto, cinco minutos y 10 minutos del ensayo en superficie: **a)** placa al 1° minuto con crecimiento, **b)** placa a los cinco minutos sin crecimiento, **c)** placa a los 10 minutos con crecimiento.

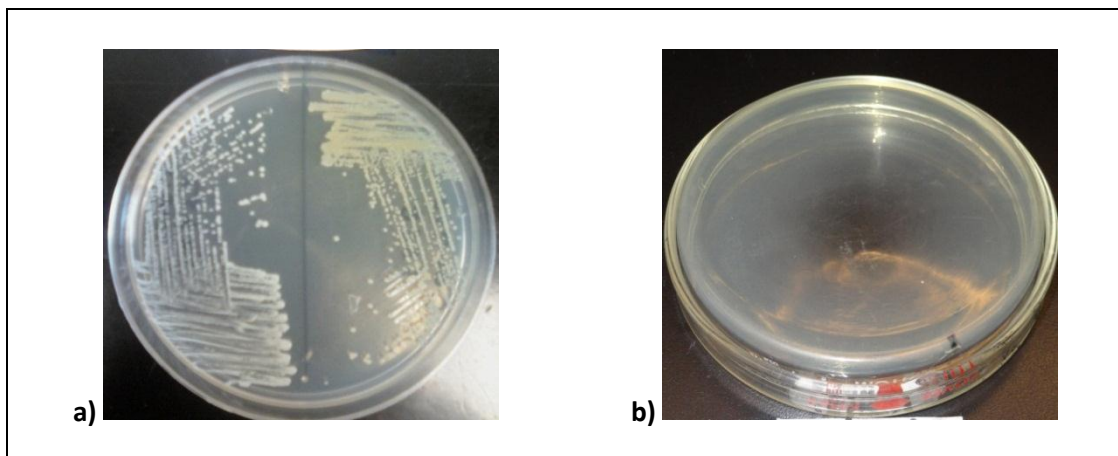
## Placas control

### Vaciado en placa





**Figura 6.1** Placas control del ensayo en superficie: **a)** placa control positivo con crecimiento, **b)** placa control negativo sin crecimiento

### Aislamiento por estría



**Figura 6.2** Placas control del ensayo en superficie: **a)** placa control positivo con crecimiento, **b)** placa control negativo sin crecimiento

## ANEXO VI Guía de Limpieza propuesta

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA		
GUÍA PARA LA LIMPIEZA DE SUPERFICIES			
Vigencia:	Elaboró: Barrientos H. Fernando	CÓDIGO: XXX-01	Página 1 de 69

### 1. OBJETIVO

1.1. Establecer el método correcto para la limpieza de las superficies.

### 2. ALCANCE

2.1. Éste procedimiento aplica a todas las superficies de trabajo (mesas de laboratorio) sucias o contaminadas.

### 3. PERIODICIDAD

3.1. Cuando se requiera la limpieza y sanitización de superficies sucias o contaminadas.

### 4. INTRODUCCIÓN

4.1. La limpieza es un tema importante en diferentes áreas ya que afecta notablemente la calidad de los productos que se generan. Debido a que los microorganismos están presentes en las superficies deberían considerarse como uno de los reservorios potenciales más importantes de contaminación.

### 5. DEFINICIONES

5.1. **Limpieza:** grado de aceptación de sustancias, partículas y microorganismos no deseables cuyo efecto sea adverso.

5.2. **Sanitización:** acción de eliminar o reducir los niveles de partículas viables por medio de agentes físicos o químicos posteriores a la actividad de limpieza, proporcionan una reducción de 3-log en la carga microbiana.

### 6. MATERIAL Y REACTIVOS

6.1. Detergente neutro



6.2. Agua purificada

6.3. Atomizador

6.4. Paños secos

6.5. Sanitizante (Hipoclorito de sodio 0.1%, Cloruro de benzalconio 1%)

## ANEXO VI Guía de Limpieza propuesta

	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA		
GUÍA PARA LA LIMPIEZA DE SUPERFICIES			
Vigencia:	Elaboró: Barrientos H. Fernando	CÓDIGO: XXX-01	Página 2 de 69

### 7. INSTRUCCIONES

#### 7.1. Limpieza de área.

7.1.1. Despejar el área, retirar equipo y material.

7.1.2. Aplicar el detergente neutro diluido en agua con ayuda de un atomizador.

7.1.3. Enjuagar el detergente inmediatamente con agua purificada y quitar el exceso de agua con un paño.

7.1.3.1. En forma progresiva y ordenada; de las áreas lo más limpias a las menos limpias.

7.1.3.2. Realizar la operación en trazos paralelos con un pequeño ángulo de inclinación cuando se cambie de curso, para que evite la recontaminación de áreas limpias.

#### 7.2. Sanitización del área.

7.2.1. Aplicar el sanitizante con ayuda de un atomizador sobre toda la superficie de manera uniforme.

7.2.2. Dejar actuar por al menos cinco minutos.

7.2.3. Enjuagar el sanitizante con agua purificada y quitar el exceso con un paño.

7.2.3.1. En forma progresiva y ordenada.

7.2.3.2. El paño para limpiar debe estar doblado para producir una presión más uniforme de mano y dedos.

7.2.3.3. Así mismo el paño tendrá la superficie suficiente para asegurar que toda el área sea limpiada.

7.2.3.4. Cambiar la superficie del paño limpiador al inicio de cada trazo o línea.

### 8. REFERENCIAS

- Comisión Interinstitucional de Buenas Prácticas de Fabricación, *Procesos de Limpieza y su Validación en Áreas de Fabricación*. México: CIPAM, 1999.
- Vellutato A. *Utilizing Environmental Monitoring data to implement a Cleaning and Disinfection Program*, México: enFarma; 2009.
- Gonzales M. *Diseño e implementación del programa de control microbiológico en el área de microbiología de un laboratorio farmacéutico* [Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo] México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México. FES Zaragoza; 2011.