



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

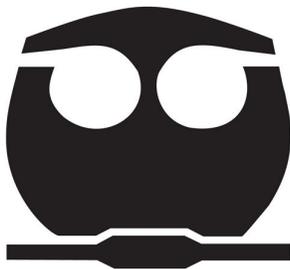
**“Evaluación de sanitizantes
in situ empleados en una
Industria Farmacéutica”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

ALEJANDRA BIBIANA BLANCAS PÉREZ



MÉXICO, D.F.

2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: María del Socorro Alpizar Ramos

VOCAL: Efrén Hernández Baltazar

SECRETARIO: Daniel García Escandón

1er. SUPLENTE: Beatriz Ruiz Villafán

2° SUPLENTE: Abraham Faustino Vega

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ALCON Laboratorios S.A. de C.V. Departamento de Control Microbiológico.

ASESOR DEL TEMA:

Q.B.P Daniel García Escandón

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.B.P Carlos Humberto Brito Gómez

SUSTENTANTE:

Alejandra Bibiana Blancas Pérez

Índice General

1. RESUMEN.....	1
2. JUSTIFICACION DEL PROBLEMA.....	3
3. OBJETIVO GENERAL.....	3
3.1 Objetivos particulares.....	3
4. HIPOTESIS.....	4
5. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	4
5.1 Métodos de Evaluación de Sanitizantes.....	5
5.1.1 Pruebas con suspensiones.....	5
5.1.2 Prueba del Método de Dilución en Uso.....	6
5.1.3 Prueba de Coeficiente de Fenol.....	6
5.1.4 Pruebas de Carrier.....	7
5.1.4.1 Método de Portador en Superficie Dura.....	8
5.1.5 Pruebas de capacidad.....	8
5.1.5.1 Prueba de Kelsey-Sykes	9
5.1.6 Método de Difusión con Disco.....	9
5.1.7 Evaluación in vitro.....	10
5.1.8 Pruebas de desafío de superficie.....	10
5.1.9 Evaluación in situ.....	13
6. GENERALIDADES.....	15
6.1 Definición de Sanitizante y Desinfectante.....	15
6.2 Definiciones de un programa de limpieza y sanitización.....	16
6.2.1 Limpieza.....	16
6.2.2 Agente de limpieza.....	16
6.2.3 Agente antimicrobiano.....	16
6.2.4 Sanitización.....	16
6.2.5 Desinfección.....	16
6.2.6 Agente Esporicida.....	16
6.2.7 Antiséptico.....	16

6.2.8 Descontaminación.....	17
6.2.9 Esterilizante.....	17
6.3 Efectos de los agentes antimicrobianos sobre el crecimiento de microorganismos.....	17
6.4 Factores que Afectan la Efectividad de un Sanitizante.....	18
6.4.1 Tipo de agente microbiano o infeccioso.....	18
6.4.1.1 Bacteria vegetativa.....	20
6.4.1.2 Micobacterias y Bacilos ácido- alcohol resistentes...	21
6.4.1.3 Esporas bacterianas.....	22
6.4.1.4 Hongos.....	23
6.4.1.5 Virus.....	23
6.4.1.6 Priones.....	24
6.4.2 Tiempo de contacto o exposición..	24
6.4.3 Curva de muerte bacteriana	25
6.4.4 Temperatura	25
6.4.5 Concentración del sanitizante	25
6.4.6 pH del medio	25
6.4.7 Estabilidad del sanitizante.	26
6.4.8 Interferencia de sustancias en el medio que actúan como barreras.....	26
6.5 Selección de un sanitizante para uso en un entorno de fabricación farmacéutica.....	26
6.6 Clasificación de Sanitizantes químicos y mecanismo de acción	28
6.6.1 Compuesto de Amonio Cuaternario (CAC).....	28
6.6.1.1 Mecanismo de acción.....	28
6.6.2 Alcoholes.....	29
6.6.2.1 Mecanismo de acción.....	29
6.6.3 Halógenos.....	30
6.6.3.1 Yodo y Yodóforos.....	30
6.6.3.1.1 Mecanismo de acción.....	31
6.6.3.2 Cloro y compuestos del cloro.....	31
6.6.3.2.1 Mecanismo de acción.....	32

6.6.3.3 Compuestos del Cloro.....	33
6.6.3.3.1 Mecanismo de acción.....	34
6.6.4 Peróxidos.....	35
6.6.4.1 Peróxido de hidrogeno.....	35
6.6.4.1.1 Mecanismo de acción.....	35
6.6.4.2 Ácido peracético.....	36
6.6.4.2.1 Mecanismo de acción.....	36
6.6.5 Fenol y derivados fenólicos.....	37
6.6.5.1 Fenol.....	37
6.6.5.1.1 Mecanismo de acción.....	37
6.6.5.2 Derivados Fenólicos.....	38
6.6.5.2.1 Mecanismo de acción.....	38
6.6.5.2.2 Bisfenoles.....	38
6.6.5.2.2.1 Mecanismo de acción.....	39
6.6.5.2.3 Hexaclorofeno.....	39
6.6.5.2.3.1 Mecanismo de acción.....	39
6.6.5.2.4 Triclosán.....	39
6.6.5.2.4.1 Mecanismo de acción.....	40
6.6.6 Aldehídos.....	40
6.6.6.1 Mecanismo de acción.....	40
6.6.6.2 Formaldehído o Formol.....	40
6.6.6.2.1 Mecanismo de acción.....	41
6.6.6.3 Glutaraldehído.....	42
6.6.6.3.1 Mecanismo de acción.....	42
6.6.6.4 O-ftalaldehído.....	43
7. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	43
7.1 Materiales y equipos.....	43
7.2 Superficies de prueba.....	44
7.3 Sanitizantes Evaluados.....	44
7.4 Material biológico, medios de cultivo y soluciones.....	45

7. 5 Metodología.....	46
7.5.1 Preparación de las suspensiones de cada microorganismo de prueba.....	46
7.5.1.1 Preparación de la Suspensión de los Microorganismos no esporulados.....	46
7.5.1.2 Preparación de la suspensión de esporas de <i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	46
7.5.1.3 Preparación de la suspensión de esporas de <i>Aspergillus brasiliensis</i>	47
7.5.2 Superficies de prueba.....	47
7.5.3 Procedimiento de la Evaluación in situ.....	48
7.5.3.1 Cuenta Control	49
8. RESULTADOS.....	50
9. DISCUSION.....	76
10. CONCLUSIONES.....	83
11. BIBLIOGRAFÍA.....	86
12. ANEXOS.....	87

1. Resumen.

En la industria farmacéutica se requiere un programa eficaz de limpieza y sanitización de ambientes controlados en los que se fabrican productos farmacéuticos que debe alcanzar estándares de limpieza específicos y deberá estar diseñado de tal modo que prevenga la contaminación química de ingredientes farmacéuticos. La sanitización debe controlar la contaminación microbiana de equipos, superficies que entran en contacto con el producto, materiales de empaque, operadores que trabajen en la fabricación de los productos farmacéuticos y esencialmente, los productos farmacéuticos.

Se realizó la evaluación de la efectividad antimicrobiana de los sanitizantes utilizados en ALCON México mediante pruebas de desafío en superficie retando las superficies de material de las áreas de fabricación y de aquellos materiales que tienen contacto con los productos fabricados con los microorganismos de prueba *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis subespecie spizizenii*, *Aspergillus brasiliensis*. Para la prueba de desafío se utilizó de acuerdo con la USP un cuadrado de 2 pulgadas x 2 pulgadas del material de prueba, el cual se inoculó con una suspensión del microorganismo de prueba, se dejó secar para que los microorganismos queden adheridos y se descontaminó mediante aspersion con cada uno de los sanitizantes a evaluar utilizados en ALCON México, para demostrar una reducción de los microorganismos durante el tiempo de contacto establecido, transcurrido el tiempo de contacto del sanitizante con la superficie de desafío se recuperaron los microorganismos de prueba mediante hisopado y enjuague con una solución neutralizante, se realizaron diluciones decimales y vertido en placa para el recuento de los microorganismos sobrevivientes en cada prueba. Es importante la evaluación de los sanitizantes utilizados en ALCON México para verificar su eficacia en la limpieza y sanitización de ambientes controlados en los que se fabrican productos farmacéuticos a través de un método de prueba "in situ". La evaluación se realizó con 3 lotes de cada sanitizante, utilizando para cada uno de ellos los diferentes materiales de prueba y a los cuales se retó con cada uno de los cinco microorganismos de prueba. Los siguientes sanitizantes

fueron evaluados: Process Vesphene Ilist. STERIS[®], Process LpH st. STERIS[®], Alcohol Isopropílico 70%, Cloro 4 %.

Abstract.

In the pharmaceutical industry requires an effective program of cleaning and sanitizing of controlled environments in which pharmaceutical products are manufactured to meet specific cleaning standards and be designed so as to prevent chemical contamination of pharmaceutical ingredients. The sanitization must control microbial contamination of equipment surfaces that come in contact with the product, packaging materials, operators working in manufacturing pharmaceuticals and essentially pharmaceuticals.

We performed the evaluation of the antimicrobial effectiveness of sanitizers used in ALCON Mexico by testing challenge defying the surface with test microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis subspecies spizizenii*, *Aspergillus brasiliensis*, the surfaces of manufacturing equipment and materials that have contact with the products manufactured. For challenge test was used according to USP a square 2 inches x 2 inches of the test material, which was inoculated with a suspension of test microorganism is allowed to dry for microorganisms still adhere and decontaminated by one spray sanitizers to assess used in ALCON Mexico, in order to demonstrate a reduction of microorganisms during the time of the contact, after the time of contact with the surface sanitizer challenge test organisms recovered by swabbing and rinsing with a neutralizing solution, and decimal dilutions were performed pour plate for enumeration of surviving organisms for each test. It is important to the evaluation of sanitizers used in ALCON Mexico for effectiveness in cleaning and sanitizing of controlled environments in which pharmaceutical products are manufactured through an in situ testing method. The Sanitizer was evaluated with 3 batches of each sanitizer using for each sanitizing testing different materials and which will challenge with each of the five test microorganisms. The following sanitizers were evaluated: Process Vesphene Ilist. STERIS[®], Process LpH st. STERIS[®], Isopropyl Alcohol 70%, Chlorine 4%.



2. Justificación del Problema.

En la industria farmacéutica la evaluación de los sanitizantes surge de la necesidad de documentar, garantizar y verificar su eficacia bactericida, fungicida y esporicida de los sanitizantes en un entorno de fabricación de productos farmacéuticos, para eliminar o disminuir el crecimiento de microorganismos y conservar la calidad de los productos fabricados.

Para la implementación exitosa de un programa de limpieza y sanitización es importante la selección de los agentes sanitizantes adecuados, el uso correcto, los métodos de aplicación, el tiempo de contacto y el monitoreo ambiental para demostrar la eficacia de los sanitizantes y así garantizar que los productos no sufran alguna contaminación durante el proceso.

3. Objetivo General.

Evaluar la efectividad antimicrobiana de los sanitizantes utilizados a través de un método in situ y obtener el 99.999% de reducción de la biocarga expuesta en un tiempo de una hora de contacto con las superficies de prueba de las áreas de fabricación.

3.1 Objetivos Particulares.

- Retar los sanitizantes con cada una de las superficies de prueba sobre las cuales son aplicados y evaluar su efectividad in situ.
- Realizar la evaluación de los sanitizantes empleados en las áreas de fabricación a la concentración de uso recomendada.
- Verificar que las concentraciones de trabajo y tiempos de exposición de los sanitizantes aplicados en las áreas de fabricación son eficaces.
- Determinar que sanitizantes presentan mayor eficacia sobre los microorganismos probados.



4. Hipótesis.

En base a las propiedades químicas de cada uno de los sanitizantes se espera obtener el efecto deseado de la actividad antimicrobiana de cada uno de ellos, logrando el 99.999% de efectividad frente a los microorganismos de prueba sobre las superficies de prueba.

5. Antecedentes Históricos.

Los procedimientos y las sustancias destinados a reducir o eliminar agentes infecciosos y contaminantes se utilizan desde hace mucho tiempo. Pasteur y Koch sentaron las bases científicas en la lucha contra los microorganismos, pero fue el médico escocés Lister quien revolucionó la cirugía al preconizar técnicas de limpieza, antisepsia y sanitización. Lister aconsejó el empleo del fenol (ácido carbólico) para la antisepsia de la piel (al 2.5%) y para desinfectar instrumental, así como desinfección del ambiente (al 5%). Este descubrimiento produjo la introducción de otros varios fenoles y de sus derivados en la práctica médica. (Negromi, 2009)

Las propiedades antisépticas y desinfectantes del yodo y del cloro se conocían mucho antes de nuestro siglo. Sommelweis introdujo el cloruro de cal en los alrededores de 1847. Smith, en 1869 y Koch, en 1881, demostraron que los compuestos inorgánicos de mercurio poseían actividad antiséptica. En 1889, Geppert comprobó que eran bacteriostáticos y no bactericidas. Este estudio condujo a la adquisición de agentes antisépticos nuevos y mejores entre los compuestos de mercurios inorgánicos y orgánicos. (Korolkovas, 1986)

En la actualidad conforme a la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (Federal Insecticide, fungicide, and Rodenticide Act o FIFRA, por sus siglas en inglés), la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU (EPA) exige que las empresas que registran productos plaguicidas antimicrobianos para la salud pública, incluyendo desinfectantes, agentes sanitizantes, agentes esporicidas, y esterilizantes, garanticen la seguridad y eficacia de los productos antes de su venta o distribución, deben declarar la composición química del producto, incluir datos toxicológicos para documentar que el producto es



seguro si se emplea según las instrucciones de la etiqueta, incluir datos de eficacia para documentar la efectividad declarada contra organismos específicos y para respaldar las instrucciones de uso del etiquetado que refleje los elementos que se requieran para el uso efectivo y seguro del producto. Si bien estas instrucciones proveen información valiosa, es probable que no sean de utilidad en relación con el uso de estos productos como sanitizantes en un entorno de fabricación. (<1072> Desinfectantes y Antisépticos, USP 35).

5.1 Métodos de Evaluación de Sanitizantes

Existe la necesidad de evaluar la eficacia de los sanitizantes y antisépticos, por lo que se han desarrollado a lo largo del tiempo métodos de prueba para evaluarlos. Algunos de los métodos de prueba de sanitizantes son Oficiales y se encuentran publicados por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) proveniente de los Estados Unidos, incluyen *la Prueba del Método de Dilución en Uso, Prueba de Coeficiente de Fenol, el Método de Portador en Superficie Dura y Prueba de Portador de Esporicida.*

5.1.1 Pruebas con suspensiones.

Las pruebas de suspensión son las más simples para la evaluación de los sanitizantes. Existen diferentes tipos de pruebas de suspensión: las pruebas de suspensión cualitativas, la prueba de Coeficiente de fenol (Rideal y Walker), Prueba del Método de Dilución en Uso y los ensayos cuantitativos de suspensión. Todos ellos tienen las siguientes características en común; un inóculo de la suspensión de un microorganismo de prueba se pone en contacto con el sanitizante a la concentración a ensayar. Después de un tiempo de exposición dado, una muestra se examina para evidenciar si hay o no microorganismos sobrevivientes. Los resultados de la prueba cualitativa se expresan como "crecimiento" (+) o "no crecimiento" (-).

En las pruebas de suspensión cuantitativas se realiza el recuento de microorganismos que sobreviven y se compara con el número de microorganismos del inóculo inicial. Con esta relación se obtiene el efecto



microbicida (ME), generalmente es aceptado un ME de al menos 99.999 % de la muerte de los microorganismos, lo que equivale a la reducción de 5 unidades logarítmicas. Se examina en estas pruebas de suspensión si los microorganismos son eliminados por un sanitizante en términos de una gama de concentraciones, diferentes periodos de exposición y varias veces de exposición.

Las pruebas de suspensión se realizan en diferentes países por ejemplo: Asociación Francesa de Normalización (AFNOR), la Sociedad Alemana para la Higiene y Microbiología, la Sociedad Alemana Veterinaria (DVG, 1988), el ensayo de suspensión Europea (Consejo de Europa) y la propuesta de la nueva prueba bactericida básica del Comité Europeo de Normalización (CEN, 1996). (Reybrouck, 1998)

5.1.2 Prueba del Método de Dilución en Uso.

Este método consiste en realizar diferentes diluciones del sanitizante. El mismo volumen de cada dilución se dispensa en tubos estériles. A cada tubo se le añade la misma cantidad de una suspensión del microorganismo de 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 de los microorganismos de prueba durante 24 a 48 horas. Al cabo de este tiempo se examina el crecimiento o ausencia de turbidez (no crecimiento). Aquellos tubos que presentan crecimiento negativo indican la dilución a la cual el sanitizante mata al microorganismo cuando es expuesto al mismo durante ese periodo de tiempo (AOAC,2000).

5.1.3 Prueba de Coeficiente de Fenol.

Fue el primer método para valorar antisépticos propuestos por Rideal y Walker en 1903. El ensayo se ha sustituido por uno mejor, propuesto por Stuart y colaboradores en 1963 (compendio), este nuevo método fue adoptado oficialmente por la AOAC y es considerado como una prueba de suspensión. La Prueba de Coeficiente de Fenol (Phenol Coefficient Method 955.11) compara la acción bactericida de un determinado sanitizante tomando como



referencia la acción bactericida del Fenol. El método estandarizado para obtener el valor del coeficiente fenólico, es una modificación de la técnica de dilución en tubo, en la cual se prepara una serie de tubos conteniendo cada uno 5 mL de diferentes diluciones del desinfectante. A la vez se prepara una segunda serie de tubos que contengan diferentes diluciones de fenol. Cada tubo de las dos series se inocula con 0.5 ml de un cultivo de 24 horas del microorganismo utilizado como prueba. A los 5, 10 y 15 minutos se recoge una alícuota de 0.5 mL de cada tubo que se inocula en otro tubo que contenga medio de cultivo estéril. Estos tubos inoculados se incuban durante 24 a 48 horas y se observa el crecimiento del microorganismo (aparición de turbidez). La mayor dilución del sanitizante que mate a los microorganismos en 10 minutos pero no los mate en 5 minutos se divide por la dilución mayor de fenol que dé los mismos resultados (AOAC,2000).

5.1.4 Pruebas de Carrier.

Pruebas de Carrier son las pruebas más antiguas. El portador (un hilo de seda , un penicilindro , un palito) se contamina por inmersión en un líquido de cultivo del microorganismo de prueba, después del secado se lleva a la dilución de uso del sanitizante durante el tiempo de exposición determinado, posteriormente se cultiva en un caldo nutriente; al no presentar ningún crecimiento del microorganismo en el caldo nutriente indica la actividad del sanitizante; si presenta crecimiento indica que no tiene efectividad el sanitizante sobre el microorganismo de prueba a esa dilución.

Ejemplos de una prueba de portador son la prueba de uso de dilución (Use-Dilution Method) y Método de Portador en Superficie Dura de la Asociación Americana de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC,1990) y el Keimträgerversuch de la Sociedad Alemana de Higiene y Microbiología (1981). El gran inconveniente de las pruebas de portadores es que la supervivencia del inóculo en el soporte no es constante y difícil de estandarizar (Reybrouck, 1998).

5.1.4.1 Método de Portador en Superficie Dura.

Este método (Use-Dilution Method 955.12, 955.14, 955.15) se utiliza para verificar la acción de un sanitizante frente a un microorganismo el cual esta adherido a una superficie inerte (Método Portador en superficie dura). El método consiste en contaminar el portador (carrier) que son penicilindros de acero inoxidable para el caso de las bacterias y para el caso de la actividad esporicida se utilizan penicilindros de porcelana, los soportes son sumergidos en una suspensión de uno de los microorganismos de prueba de concentración conocida por un tiempo determinado, después del tiempo de exposición, el soporte es extraído de la suspensión y se deja secar a 36 ± 1 ° C por 40 ± 2 min. Posteriormente el soporte es sumergido en una dilución conocida de sanitizante por 10 minutos a 20°C, finalizado el tiempo de exposición , el portador es retirado del sanitizante y se deposita en un medio de cultivo que contenga un neutralizante para permitir el desarrollo de los microorganismos sobrevivientes y se incuba a 36 ± 1 ° C durante 48 ± 2 h . La lectura se realiza de forma cualitativa observando si hay crecimiento o no, por medio de la presencia o ausencia de turbidez en el medio de cultivo. Se utilizan variaciones de este método para evaluar la eficacia de los agentes sanitizantes contra las Endosporas, las Micobacterias y Hongos (AOAC,2000).

5.1.5 Pruebas de capacidad.

La prueba de capacidad se realiza con un instrumento sucio que se coloca en un recipiente con sanitizante, una cierta cantidad de suciedad y los microorganismos se añade a la solución. En una prueba de la capacidad, el sanitizante es desafiado repetidamente por adiciones sucesivas de suspensión de microorganismos hasta que su capacidad de matar se ha agotado. Las Pruebas de Capacidad simulan las situaciones prácticas de limpieza y sanitización de instrumentos. La mejor prueba de capacidad conocida es la prueba de Kelsey-Sykes (1969).



5.1.5.1 Prueba de Kelsey-Sykes.

Prueba de Kelsey-Sykes es una prueba triple desafío, diseñado para determinar las concentraciones de sanitizante que se harán efectivas en un lugar limpio y sucio. El sanitizante es desafiado por tres adiciones sucesivas de una suspensión bacteriana durante el transcurso de la prueba. La concentración del sanitizante se reduce a la mitad por la presencia de la materia orgánica (células de levadura tratadas en autoclave), que se acumula a una concentración final de 0.5%. El método se puede llevar a cabo en condiciones de "limpieza" o "suciedad". Las diluciones del sanitizante se hacen en agua dura para condiciones de limpieza y en suspensión de levadura para condiciones de suciedad. El microorganismo de ensayo solo o con levadura se añade a 0, 10 y 20 minutos de intervalo. El tiempo de contacto del sanitizante y el microorganismo de prueba es de 8 min. Después del tiempo de contacto se incuban a 32° C durante 48 horas y el crecimiento se evalúa por la turbidez. Al sanitizante se evalúa la capacidad para matar a los microorganismos o la falta de ella. Establece que contienen dos o más cultivos negativos se registran como un resultado negativo. La prueba de la capacidad de Kelsey y Sykes da una buena guía para la dilución de la preparación a ser utilizado (Reybrouck, 1998).

5.1.6 Método de Difusión con Disco.

El método de difusión con disco se utiliza en los laboratorios de práctica para evaluar la eficacia de un agente químico. Un disco de papel de filtro se embebe con una sustancia química y se coloca sobre una placa de Agar previamente inoculada e incubada con el microorganismo de prueba. Si la sustancia química es eficaz después de la incubación se puede observar una zona clara que presenta un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco (Tortora, 2007).



5.1.7 Evaluación in vitro.

En México se tomó como referencia la Norma Mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999 “Métodos Generales de Análisis - Determinación de la Actividad Antimicrobiana en Productos Germicidas”, para la realización de la Evaluación in vitro. La Norma Mexicana se basa en determinar el porcentaje de reducción de un número determinado de microorganismos, cuando se ponen en contacto con un sanitizante, bajo condiciones de prueba específicas.

Para determinar su efectividad antimicrobiana, se prepara el sanitizante y se transfiere 99 mL en matraces Erlenmeyer con tapón de rosca estériles, se inocula en forma individual cada matraz con cada uno de los microorganismos de prueba con 1 mL de suspensión de microorganismos de prueba (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) que contiene entre 75 a 125 x10⁸ UFC/ mL. Se Agita el matraz con la muestra inoculada y transcurridos 30 segundos de contacto de la suspensión del microorganismo con la solución de sanitizante se transfiere inmediatamente 1 mL de la misma , a un tubo de ensayo conteniendo 9 mL de solución neutralizante, se realizan diluciones y se realiza vertido en placa, se incuba a 35-37°C por 48 horas. Se realiza la cuenta microbiana para determinar la concentración de células sobrevivientes en UFC/ mL en el matraz. Para un producto etiquetado como germicida, debe tener un por ciento de reducción de la cuenta viable de 99,999 % en 30 segundos de contacto a la concentración de uso recomendada.

5.1.8 Pruebas de desafío de superficie.

En el capítulo <1072> Desinfectantes y Antisépticos de la USP 35, se encuentra información de manera generalizada para demostrar la eficacia de un sanitizante en un entorno de fabricación de productos farmacéuticos, se considera que debe realizarse las siguientes pruebas:

1. **Pruebas de dilución de uso** (analizar la eficacia de los sanitizantes a varias concentraciones y tiempos de contacto contra una amplia variedad de microorganismos estándares de prueba y aislamientos ambientales).



- 2. Pruebas de desafío de superficie** (usando microorganismos estándares de prueba y microorganismos que son aislamientos típicos, aplicando sanitizantes sobre las superficies a la concentración de uso seleccionada y durante un tiempo de contacto especificado y determinando la reducción del logaritmo de los microorganismos de desafío).

Posterior a la demostración de la eficacia de un sanitizante se debe realizar la comparación estadística de la frecuencia de aislamiento y números de microorganismos aislados antes y después de la implementación de un nuevo sanitizante. Esto se considera necesario ya que, según lo establecido por las normas de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP, por sus siglas en inglés), los pasos críticos de un proceso, como la sanitización de las áreas de procesamiento aséptico, requieren validación, porque los requisitos de registro de la EPA no incluyen instrucciones sobre cómo usar los sanitizantes en las industrias farmacéutica, biotecnológica y de dispositivos médicos.

Para la realización de las Pruebas de desafío de superficie, de acuerdo con la USP, los microorganismos de prueba se enumeran por medio de métodos de hisopado, enjuague de superficie o placa de contacto, es necesario inocular una cantidad suficiente de microorganismos en un cuadrado de 2 pulgadas x 2 pulgadas de la superficie que está siendo descontaminada, para demostrar una reducción de microorganismos durante un tiempo de contacto predeterminado.

En las Pruebas de desafío de superficie se pueden utilizar los Agentes Neutralizantes para neutralizar la actividad de los agentes antimicrobianos (ver Tabla 1). Pueden añadirse al diluyente seleccionado o al medio preferentemente antes de su esterilización. La eficacia de los neutralizadores y su capacidad para recuperar del material los microorganismos inoculados deberían demostrarse durante los estudios de dilución de uso o de desafío de superficie.



Tabla 1. Agentes Neutralizantes comunes / Métodos para Sustancias de Interferencia.

Sustancia de interferencia	Agentes Neutralizantes Potenciales / Método
Glutaraldehído, mercuriales	Sulfito ácido de sodio (Bisulfito de sodio)
Fenólicos , alcohol, aldehídos, sorbato	Dilución
Aldehídos	Glicina
Compuestos de amonio cuaternario (CAC), parahidroxibenzoatos (parabenos), bisguanidas.	Lecitina
CAC, yodo, parabenos	Polisorbato
Mercuriales	Tioglicolato
Mercuriales, halógenos, aldehídos	Tiosulfato
EDTA (edetato)	iones de Mg o Ca

En la siguiente tabla se enlistan los microorganismos de desafío típicos que pueden emplearse para las pruebas de desafío de superficie, para la evaluación de los sanitizantes de acuerdo a la USP.

Tabla 2. Microorganismos de Desafío Típicos

Microorganismos de Desafío AOAC	Aislamientos Ambientales Típicos
Bactericida: <i>Escherichia coli</i> ATTC 11229, <i>S.aureus</i> ATTC 6538, <i>P.aeruginosa</i> ATTC 15442.	Bactericida: <i>Micrococcus luteus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Corynebacterium jeikeium</i> , <i>P. vesicularis</i> .
Fungicida: <i>C. albicans</i> ATTC 10231 ó 2091; <i>Penicillium chrysogenum</i> ATTC 11709; <i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404.	Fungicida: <i>P.chrysogenum</i> , <i>A. brasiliensis</i> .
Esporicida: <i>B.subtilis</i> ATCC 19659.	Esporicida: <i>B. sphaericus</i> , <i>B. thuringiensis</i> .



En la siguiente tabla se muestra un listado de materiales que comúnmente son usados en la construcción de cuartos limpios. Dada la variedad de materiales, se debe analizar cada material por separado para validar la eficacia de un sanitizante determinado.

Tabla 3. Superficies Típicas a Descontaminar con Sanitizantes en el Área de Fabricación de Productos Farmacéuticos.

Material	Aplicación
Acero inoxidable de grados 304L y 316L	Superficies de trabajo, equipo de llenado y tanques
Vidrio	Ventanas y recipientes
Plástico, vinilo	Cortinas
Plástico , policarbonato	Revestimiento aislante
Lexan ® (plexiglas)	Pantallas protectoras
Yeso recubrimiento con epoxilo	Paredes y techos
Plástico reforzado con fibra de vidrio	Paneles de las paredes
Tyvek ®	Envoltorio de equipos
Baldosas de terrazo	Pisos

5.1.9 Evaluación in situ

Para el desarrollo de la metodología de la Evaluación in situ de los sanitizantes, cabe mencionar que no hay una Norma o Metodología establecida como tal en la industria farmacéutica, por lo que se tomó como referencia la Norma Mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999 “Métodos Generales de Análisis - Determinación de la Actividad Antimicrobiana en Productos Germicidas” y la información que se encuentra en el capítulo <1072> Desinfectantes y Antisépticos de la USP sobre las pruebas de desafío de superficie.

Previamente a la Evaluación in situ, se realizó la evaluación in vitro en ALCON México, en la cual se evaluaron los mismos sanitizantes y se retó con las bacterias establecidas en la Norma Mexicana (*Escherichia coli*, *S.aureus*), con



uno de los microorganismos que se encontró en el monitoreo ambiental con mayor frecuencia (*S.epidermidis*) y con microorganismos esporulados (*A. brasiliensis*, *Bacillus subtilis subespecie spizizenii*). Se continuó trabajando con los mismos microorganismos para la evaluación in situ, para verificar la efectividad de los sanitizantes sobre las superficies que se encuentran en las áreas de fabricación.

La evaluación in situ se realizó en el laboratorio para evitar la contaminación con los microorganismos en las áreas de fabricación, de tal forma que se simuló utilizando materiales que son usados en la construcción y que están en mayor contacto con los productos fabricados de acuerdo a la USP. Una vez seleccionados los materiales, se procedió a la limpieza de los mismos con detergente Extran®, se enjuagó con agua purificada y se dejó secar a temperatura ambiente.

Se realizaron pruebas de secado del microorganismo con el objetivo de seleccionar las mejores condiciones para adherir los microorganismos a las superficies de prueba. Se eligió solo un tipo de superficie de prueba (acero inoxidable), se inoculó con la misma cantidad de suspensión de un microorganismo y se probaron a tres diferentes temperaturas de secado. Se observó que el secado de temperatura ambiente tardó 2 horas, en la incubadora de 30 -35 ° tardó 1.5 horas, en la incubadora de 35- 37° 1 hora, en todas las condiciones de secado se recuperó el microorganismo. Por lo que se decidió utilizar la temperatura de secado de 35 – 37°C para reducir los tiempos del experimento.

La selección del tiempo de contacto del sanitizante sobre la superficie de desafío contaminada fue en base al tiempo que se deja actuar el sanitizante en las áreas de fabricación.



6. Generalidades.

6.1 Definición de Sanitizante y Desinfectante.

Un agente antimicrobiano puede ser clasificado como un desinfectante o un sanitizante, dependiendo de si se utiliza para matar a los agentes infecciosos potenciales o para reducir la biocarga microbiana.

La Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration o FDA, por sus siglas en inglés) define un **sanitizante** como un agente químico o físico que reduce los niveles de contaminación por microorganismos presentes en las superficies ambientales inanimadas.

La EPA (Agencia de Protección Ambiental) indica que los sanitizantes también se utilizan para reducir, pero no eliminar necesariamente, los microorganismos del ambiente en superficies inanimadas a niveles considerados seguros tal como se determina por los códigos y reglamentos de salud pública (Martínez, 2006)

La USP lo define como un agente que reduce, en superficies inanimadas, la cantidad de toda forma de vida microbiana, incluyendo hongos, virus y bacterias (<1072> Desinfectantes y Antisépticos, USP 35).

La Administración de Alimentos y Medicamento (FDA) define un **desinfectante** como un agente químico que ayuda a eliminar los microorganismos no deseados de superficies medioambientales inanimadas.

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) especifica que un desinfectante es un agente químico que se utiliza en superficies inanimadas duras y objetos para destruir o inactivar irreversiblemente los hongos y bacterias infecciosas pero no necesariamente sus esporas (Martínez, 2006).

La USP lo define como un agente físico o químico que al aplicarse sobre una superficie destruye o elimina formas vegetativas de microorganismo nocivos (<1072> Desinfectantes y Antisépticos, USP 35).



En base a lo anterior, ambas definiciones sanitizante y desinfectante tienen como objetivo la reducción o eliminación de microorganismos sobre las superficies inanimadas, existe una línea muy delgada entre sus diferencias por lo que se utilizará la definición de sanitizante para fines prácticos de este trabajo.

6.2 Definiciones de un programa de limpieza y sanitización.

6.2.1 Limpieza: Al proceso para la disminución de partículas no viables a niveles establecidos (NOM-059-SSA1-2013).

6.2.2 Agente de limpieza: Agente que elimina de la superficie de las instalaciones y equipos residuos de productos que puedan inactivar a los agentes sanitizantes o albergar microorganismos (<1072> Desinfectantes y Antisépticos, USP 35).

6.2.3 Agente antimicrobiano: Es un compuesto químico, natural o sintético, que mata o inhibe el crecimiento de los microorganismos (Brock ,2004).

6.2.4 Sanitización: A la acción de eliminar o reducir los niveles de partículas viables por medio de agentes físicos o químicos, posterior a la actividad de limpieza (NOM-059-SSA1-2013).

6.2.5 Desinfección: Es la eliminación o destrucción de los agentes patógenos de los objetos inanimados. Organismos ambientales no patógenos no pueden ser eliminados completamente a través de la desinfección (Martínez, 2006).

6.2.6 Agente Esporicida: Agente que destruye esporas fúngicas y bacterianas cuando se usa en una concentración suficiente durante un tiempo de contacto específico. Se espera que mate todo microorganismo vegetativo (<1072> Desinfectantes y Antisépticos, USP 35).

6.2.7 Antiséptico: Agente que inhibe o destruye microorganismos sobre un tejido vivo, incluyendo la piel, cavidades orales y heridas abiertas. (<1072> Desinfectantes y Antisépticos, USP 35).



6.2.8 Descontaminación: Eliminación de microorganismos mediante desinfección o esterilización. (<1072> Desinfectantes y Antisépticos, USP 35).

6.2.9 Esterilizante: Agente que destruye toda forma de vida microbiana, incluyendo hongos, virus y todas las formas bacterianas y sus esporas. Los esterilizantes son agentes líquidos o de fase vapor (<1072> Desinfectantes y Antisépticos, USP 35).

6.3 Efectos de los agentes antimicrobianos sobre el crecimiento de microorganismos.

Los agentes antimicrobianos pueden diferenciarse según el efecto que producen en los microorganismos, varían con respecto a su toxicidad selectiva. Algunos actúan de forma no selectiva y sobre todos los tipos de células, otros presentan una mayor selectividad y toxicidad para los microorganismos que para los tejidos animales.

Muchas sustancias químicas tienen efectos nocivos sobre los microorganismos porque tienen la capacidad de inhibirlos o matarlos. La acción sobre ellos permite clasificarlos de la siguiente manera:

1) Los agentes que matan microorganismos, pero no les producen rompimiento o lisis se denominan *agentes- cida*, con un prefijo que indica el tipo de microorganismo que mata. Así que los agentes que destruyen bacterias se les da el nombre de bactericidas y de esta forma tenemos también agentes fungicidas, esporicidas, virucidas, etcétera.

2) Los agentes que no matan pero dificultan o inhiben el crecimiento de los microorganismos se denominan *agentes -estáticos*, también se les asigna un nombre dependiendo del tipo de microorganismo sobre el cual ejercen su acción, de esta manera se tiene bacteriostáticos, fungistáticos, etcétera.

Las células bacterianas no mueren porque los agentes bacteriostáticos se unen a los ribosomas e inhiben la síntesis de proteínas. Sin embargo, esa es una unión débil y al disminuir la concentración del agente se libera de los ribosomas y se reanuda el crecimiento bacteriano. (Brock, 2004)



Este límite no siempre es neto, porque a veces depende de la concentración y del tiempo. Los bactericidas actúan en la fase de crecimiento, mientras que los bacteriostáticos lo hacen en la fase estacionaria (Negromi, 2009).

3) Los agentes bacteriolíticos causan la muerte celular produciendo lisis, la rotura celular se detecta por un descenso en el número de células o en la turbidez, después de que se haya añadido el agente. (Montoya, 2008)

6.4 Factores que Afectan la Efectividad de un Sanitizante.

En el proceso de sanitización no solo participan los microorganismos y el agente químico (sanitizante), sino que intervienen factores que afectan su actividad:

- El tipo de agente microbiano o infeccioso.
- El tiempo de contacto.
- La curva de muerte del agente infeccioso.
- La Temperatura.
- La concentración.
- El pH.
- La formulación o tipo de preparado.
- La interferencia de sustancias en el medio que actúen como barrera.

6.4.1 Tipo de agente microbiano o infeccioso.

Los diferentes tipos de microorganismos varían en su respuesta a los antisépticos y sanitizantes. Debido a que los microorganismos presentan una resistencia intrínseca (innata) que es una propiedad natural, cromosómicamente controlada de una célula bacteriana que le permite eludir la acción de un antiséptico o sanitizante, o puede ser resistencia adquirida por mutación o adquisición de plásmidos (auto-replicante, ADN extracromosómico) o transposones (integrando cromosómico o plásmido, casetes transmisibles ADN). Esta resistencia que presentan los microorganismos a los sanitizantes y antisépticos es debida a los diversos tipos de microorganismos que reaccionan de manera diferente, ya que poseen estructura celular, composición y fisiología diferente cada uno de ellos. Tradicionalmente, la susceptibilidad microbiana a los antisépticos y sanitizantes se ha clasificado sobre la base de



estas diferencias estructurales, por lo que esta resistencia no es la misma que se presenta frente a los antibióticos. (McDonnell, 1999)

El desarrollo de resistencia microbiana a los sanitizantes es menos probable que ocurra a niveles significativos, ya que los sanitizantes son agentes biocidas más poderosos que los antibióticos. Además se aplican normalmente en mayores concentraciones contra poblaciones de microorganismos más bajas que, por lo general, no están en crecimiento activo; es por ello que la presión selectiva para el desarrollo de resistencia es menos profunda. (<1072> Desinfectantes y Antisépticos, USP 35)

En los últimos años se ha avanzado considerablemente en la comprensión más completa de las respuestas de los diferentes tipos de bacterias (bacterias, micobacterias, no esporuladas, y esporas bacterianas) con los agentes antibacterianos. Muchos biocidas tienden a ser más eficaces contra las grampositivas, como grupo, que contra las bacterias gramnegativas. Esto se ilustra en la Fig.1, que presenta una jerarquía simplificada de la resistencia relativa de los principales grupos microbianos a los biocidas.

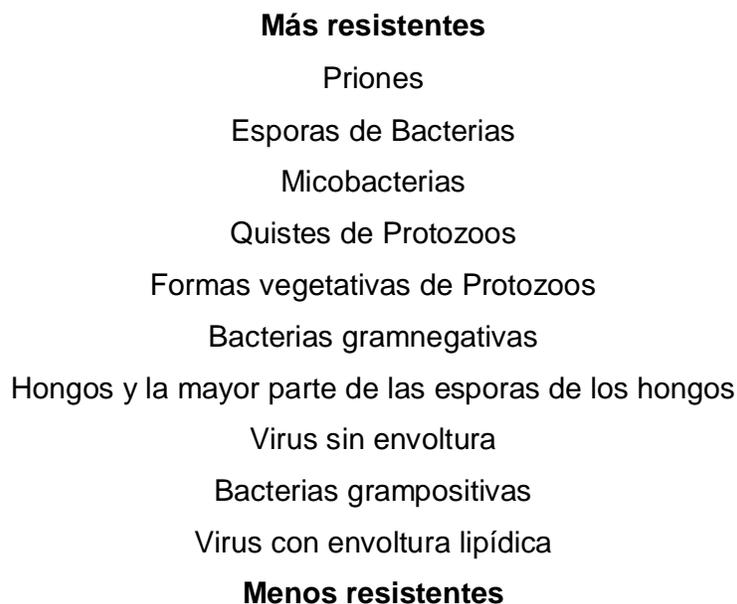


Fig.1 Orden decreciente de la resistencia de los microorganismos a los biocidas químicos (Tortora, 2007).



Un antiséptico o sanitizante debe alcanzar su sitio de acción, para ello debe cruzar las capas exteriores de la célula. La naturaleza y composición de estas capas dependen del tipo de organismo y puede actuar como una barrera de permeabilidad, en la que puede haber una reducción de la absorción e impedir su entrada. Alternativamente, pero menos comúnmente, las enzimas sintetizadas constitutivamente puede provocar la degradación de un compuesto. Enseguida se menciona las diferencias estructurales de cada grupo, que hace que los microorganismos puedan eludir los sanitizantes.

6.4.1.1 Bacteria vegetativa.

Por lo general, son destruidas rápidamente por la mayor parte de los sanitizantes químicos; Bacterias gramnegativas tienden a ser más resistentes que los microorganismos grampositivos.

a) Bacterias grampositivas.

La pared de estas bacterias está compuesta de peptidoglicano y ácidos teicoicos, pero ninguno de estos parece ser una gran barrera para la acción y entrada de los sanitizantes y antisépticos.

Existen otros microorganismos que pueden crecer con un aspecto mucoso y otros no, pero estas últimas mueren mucho más rápido, por lo que se podría decir que la capa mucosa juega un papel importante al actuar como barrera física a la penetración de sanitizantes o como una capa suelta que interactúa o absorbe el biocida. (McDonnell, 1999)

b) Bacterias gramnegativas.

Las bacterias gramnegativas son generalmente más resistentes a los antisépticos y sanitizantes. La membrana externa de estas bacterias interactúa como una barrera que limita la entrada de algunos sanitizantes por los lipopolisacáridos (LPS) que impiden el acceso de moléculas hidrófobas y las lipoproteínas evitan la difusión pasiva de moléculas hidrófilas. Muchos autores consideran que el peptidoglucano puede ser una gran barrera, porque el contenido de este es mucho más bajo que el que se encuentra en las bacterias grampositivas, entonces las hace menos sensibles a muchos agentes



químicos. Mientras que las porinas (orificios estructurales en las paredes de las bacterias gramnegativas) presentan una selectividad muy elevada para las moléculas que permiten ingresar a la célula moléculas hidrófilas (Tortora, 2007).

Las bacterias que muestran un alto nivel de resistencia a los antisépticos y sanitizantes incluyen *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Proteus spp.*, y *Providencia stuartii* e incluso pueden crecer de modo activo en algunos sanitizantes y antisépticos, en especial en los compuestos de amonio cuaternario. La membrana externa de *P. aeruginosa* es responsable de su alta resistencia, en comparación con otros organismos, hay diferencias en la composición de LPS y en el contenido de cationes de la membrana externa.

6.4.1.2 Micobacterias y Bacilos ácido- alcohol resistentes.

Mycobacterium tuberculosis y otros bacilos ácido-alcohol resistentes, como *Mycobacterium leprae* y las Micobacterias atípicas, no son sensibles a los microbicidas acuosos. Estos microorganismos son susceptibles al alcohol al 70% con fenol, formaldehído, yodo o con jabones con un alto contenido de fenol.

Las Micobacterias constituyen otro grupo de bacterias no formadoras de endosporas que exhiben una resistencia mayor que la habitual contra los biocidas químicos. Este grupo incluye a *Mycobacterium tuberculosis*, el patógeno que causa tuberculosis (Negromi, 2009). La pared celular de este microorganismo y de otros miembros de este género tiene como componente una cera con alto contenido de lípidos y es una estructura altamente hidrófoba con un esqueleto micolil arabinogalactano-peptidoglicano. El peptidoglicano está unido covalentemente al copolímero de polisacáridos (arabinogalactano) compuesto de arabinosa y galactosa esterificados a los ácidos micólicos. También están presentes los lípidos complejos, lipopolisacáridos (LPS), y proteínas, incluyendo los canales de porinas a través de la cual las moléculas hidrófilas pueden difundir en la célula.



Similares estructuras de la pared celular existen en todas las especies de micobacterias examinados hasta la fecha proporcionando una barrera efectiva a la entrada de estos agentes sanitizantes. Debido a la naturaleza altamente hidrófoba de la pared celular, biocidas hidrófilos son generalmente incapaces de penetrar en la pared celular de micobacterias en concentraciones suficientemente altas para producir un efecto letal. (McDonnell, 1999)

6.4.1.3 Esporas bacterianas.

Las esporas bacterianas son afectadas por una cantidad relativamente escasa de biocidas, esta resistencia puede ocurrir dentro de la etapa de esporulación y puede ser un evento que puede ocurrir en etapas temprana, intermedia o tardía. (Tortora, 2007)

Las esporas son mucho más complejas debido a que poseen múltiples capas. La capa externa se conoce como exosporium, una fina y delicada cubierta de carácter protéico y se presenta en algunas especies. Dentro de éstas se presentan las cubiertas de la spora compuestas por capas de proteínas. El córtex o corteza es una capa de peptidoglucano de uniones laxas y el protoplasto contiene pared, membrana, citoplasma, nucleoide, ADN, ARN, ácido dipicolínico, calcio, magnesio, fosforo.

El desarrollo inicial y la madurez del córtex al igual que el ácido dipicolínico, están implicados en el desarrollo de resistencia a los compuestos fenólicos o los derivados de amonio cuaternario, poseen un escaso efecto sobre la viabilidad de los esporos bacterianos, no obstante, estos agentes pueden inhibir determinados estadios del ciclo esporogénico, por lo que pueden establecerse tres áreas sobre las cuales tiene lugar el efecto letal o inhibitorio :

- Durante las fases de esporulación.
- Sobre el espora maduro.
- Durante la germinación y /o crecimiento.



Algunos sanitizantes activos que son oxidantes como el peróxido de hidrogeno y el cloro, son capaces de desestabilizar el ácido dipicolínico en las esporas (McDonnell, 1999). Debido a su resistencia es necesario recurrir a productos químicos de alta toxicidad durante tiempos prolongados (10 hrs). La utilización de estos agentes químicos sólo es un recurso válido cuando quiere obtenerse un nivel alto microbiológico de sanitización o si es posible aplicar otros métodos de esterilización (Negromi, 2009).

6.4.1.4 Hongos.

En comparación con las bacterias, se sabe muy poco acerca de la manera en que los hongos pueden eludir la acción de los antisépticos y sanitizantes. Los hongos, en general son más resistentes que las bacterias a los sanitizantes comunes, tales como los fenoles, compuestos clorados, yodo, cristal violeta y compuestos mercuriales orgánicos. Algunos compuestos de amonio cuaternario poseen actividad antifúngica. En ciertos casos pueden aplicarse compuestos clorados y algunos yodados, en conjunción con otros métodos (Tortora, 2007).

Los hongos son más resistentes que las levaduras y considerablemente más resistentes que las bacterias no esporuladas. Las esporas de los hongos son menos resistentes que las esporas bacterianas a los agentes biocidas.

Los Hongos presentan una barrera para reducir la entrada del sanitizante. También la edad de los cultivos influencia la resistencia y la sensibilidad hacia los sanitizantes, ya que la pared es mucho más sensible en fase estacionaria que en fase logarítmica (McDonnell, 1999).

6.4.1.5 Virus.

Los virus no presentan una resistencia especial a los biocidas, si bien debe hacerse una distinción entre los que poseen una envoltura lipídica y los que no la poseen. Los antimicrobianos con actividad liposoluble son más eficaces contra los virus con envoltura. En estos casos el rotulo indicara la eficiencia del producto contra los virus lipófilos. Los virus que no tienen envoltura sino sólo



una cubierta proteica son más resistentes, es decir que menos biocidas son eficaces contra ellos (Tortora, 2007).

La acción virucida de los compuestos químicos está menos definida. El yodo, el cloro, el glutaraldehído y el formaldehído parecen ser los agentes más activos contra algunos virus. Los solventes orgánicos, tales como cloroformo y el éter, se utilizan en ocasiones para inactivar virus con envoltura. En cuanto a su sensibilidad, los virus desnudos son menos sensibles a los agentes químicos (Negromi, 2009).

6.4.1.6 Priones.

Los agentes infecciosos con mayor resistencia a los antisépticos y sanitizantes son los priones, las esporas bacterianas, las micobacterias, los virus desnudos o de pequeño tamaño y las esporas de los hongos (Negromi, 2009).

Los priones son proteínas infecciosas que causan enfermedades neurológicas, las encefalopatías espongiformes, como la conocida enfermedad de la vaca loca, extraordinariamente son resistentes a los métodos de sanitización y a los procedimientos de esterilización habituales, como ebullición, alcohol al 70 %, glutaraldehído, formaldehído al 4% (usado para la preservación de biopsias), radiaciones ionizantes y óxido de etileno. En contraste, son comparativamente sensibles a sustancias que digieran, desnaturalicen o modifiquen químicamente proteínas. La Organización Mundial de la Salud ha recomendado que pueden ser inactivados por calor húmedo a 134°C durante 18 minutos combinado de una solución de hidróxido de sodio (Tortora, 2007).

6.4.2 Tiempo de contacto o exposición.

Los microorganismos no mueren en forma instantánea ni simultánea, sino que deben estar en contacto con el agente químico durante un tiempo mínimo para lograr el efecto deseado.

El tiempo necesario para que el sanitizante produzca la muerte de los microorganismos es directamente proporcional al logaritmo de la concentración



bacteriana inicial. Se requiere mayor tiempo para destruir concentraciones elevadas de microorganismos que para destruir las concentraciones bajas.

6.4.3 Curva de muerte bacteriana.

Esta curva se obtiene al graficar la concentración de microorganismos sobrevivientes en función del tiempo transcurrido. El único criterio válido de muerte es la pérdida irreversible de la capacidad de reproducción. Cuando una población bacteriana se expone a un agente letal, se produce, a medida que transcurre el tiempo, una progresiva reducción en el número de bacterias sobrevivientes. Por lo tanto, debe reducirse la carga microbiana inicial a fin de asegurar una mayor eficiencia en cuanto a la inactivación y la muerte de los microorganismos.

6.4.4 Temperatura.

El aumento de la temperatura acelera la destrucción de los microorganismos sometidos a ella. Una pequeña cantidad de un producto químico dará el mismo producto que se hubiera probado a temperatura más baja. Sin embargo, otros sanitizantes pueden inactivarse con el calor, como el cloro.

6.4.5 Concentración del sanitizante.

La concentración se relaciona con el tiempo, ya que varía la velocidad de la reacción. Generalmente, cuanto mayor sea la concentración menor será el tiempo, según el agente químico utilizado. La relación es de tipo exponencial y el valor difiere según las sustancias y microorganismos (Forbes,2009).

6.4.6 pH del medio.

El grado de ionización de los sanitizantes dependerá del pH del medio. Los cambios del pH no solo pueden afectar la actividad de un sanitizante, sino que también pueden incidir en la velocidad del crecimiento de las células bacterianas y en el estado fisicoquímico de sus superficies. Mientras que un pH de 6-8 es óptimo para el desarrollo de algunas bacterias, la velocidad de crecimiento de otras disminuye cuando se acidifica o se alcaliniza el medio.

Los agentes catiónicos, como los compuestos de amonio cuaternarios, por lo general son más activos en solución alcalina que en solución ácida. Los fenoles



y el hipoclorito son más eficaces en un medio ácido. La actividad esporicida del glutaraldehído en solución acuosa es favorecida por un pH alcalino, posiblemente como resultado de un incremento en la interacción con grupos amino (Negromi, 2009).

6.4.7 Estabilidad del sanitizante.

Los sanitizantes deberían ser estables en sus formulaciones originales, es decir, sin diluir, para mantener sus propiedades a lo largo del tiempo. Los sanitizantes pueden inactivarse si se mezcla con detergentes y otros sanitizantes no adecuados. Por ello es necesario verificar periódicamente la actividad de los mismos, especialmente cuando han sido diluidos.

6.4.8 Interferencia de sustancias en el medio que actúan como barreras.

La sanitización química se realiza por alguna combinación con algunos de los componentes de la célula microbiana, las sustancias orgánicas (sangre, suero, pus, líquidos corporales) y otros materiales (como tejidos, textiles, gomas, caucho, polvos, sales) pueden alterar o interferir en el resultado de dicha actividad.

Las sustancias orgánicas pueden influir por:

1. Formación de una cubierta protectora sobre el microorganismo que impida la acción del sanitizante.
2. Formación de compuestos no microbicidas, inertes o poco activos (alteración del principio activo por reacciones de precipitación, reducción, etcétera.)
3. Adsorción del sanitizante a otro elemento que le haga perder su eficacia (Negromi, 2009).

6.5 Selección de un sanitizante para uso en un entorno de fabricación farmacéutica.

Al seleccionar un sanitizante para usar en un área de fabricación farmacéutica, debe ser considerado lo siguiente: el número y tipos de microorganismos para ser controlados, el espectro de actividad de los sanitizantes disponibles en el mercado, la reputación del proveedor del sanitizante; las reivindicaciones como



un esterilizante; el sanitizante con el apoyo de los registros de la EPA, la concentración, el método de la aplicación, y el tiempo de contacto del sanitizante, la naturaleza de la superficie del material a ser sanitizada, y su compatibilidad con el sanitizante, la cantidad de compuestos orgánicos en la superficie que pueden inactivar al sanitizante; la posible necesidad de mantener una actividad residual bactericida del sanitizante en la superficie; la corrosividad provocada por un sanitizante a un equipo con la aplicación repetida; las consideraciones de seguridad para los operadores al aplicarlo; la compatibilidad con agentes de limpieza y otros sanitizantes.

Cuando se emplean sanitizantes en el entorno de fabricación, se debe tener cuidado para evitar la contaminación del producto farmacéutico con sanitizantes químicos dada la toxicidad inherente de los mismos (<1072> Desinfectantes y Antisépticos, USP 35).

Mediante la lectura del rótulo del envase del sanitizante es posible obtener bastante información acerca de las propiedades de un sanitizante. El rótulo suele indicar los grupos de microorganismos contra los que actúa de manera eficaz el sanitizante. Es necesario recordar que la concentración de un sanitizante influye en su actividad, de modo que se debe diluir exactamente según las indicaciones del fabricante.

También se debe considerar la naturaleza del material que se va a sanitizar, por ejemplo si hay materia orgánica que pueda interferir sobre la actividad del sanitizante, de manera similar, el pH del medio tiene un gran efecto sobre la actividad del sanitizante.

Otra consideración muy importante es si el sanitizante puede entrar en contacto fácilmente con los microorganismos. A veces es preciso lavar y enjuagar la zona antes de aplicar el sanitizante, en general la sanitización es un proceso gradual. Por lo tanto, para ser eficaz un sanitizante podría requerir varias horas de contacto con la superficie a tratar (Tortora, 2007).



6.6 Clasificación de Sanitizantes químicos y mecanismo de acción.

6.6.1 Compuesto de Amonio Cuaternario (CAC).

Los Compuestos de Amonio Cuaternario son agentes tensoactivos, su capacidad limpiadora se debe a la porción con carga positiva de la molécula, el catión. Su nombre proviene del hecho de que son derivados del ion amonio tetravalente NH_4^+ . Existen dos compuestos de amonio cuaternario muy utilizados son el Cloruro de Cetilpiridinio y el Cloruro de Benzalconio, que fue el primero que se comercializó en 1935 por su baja toxicidad y su buena acción detergente. Presentan una fuerte acción antimicrobiana, son incoloros, inodoros, insípidos, solubles y estables. La materia orgánica interfiere sobre su actividad y se neutraliza con el jabón y detergente aniónico (Tortora, 2007).

En 1955 surgieron los compuestos de amonio cuaternario de segunda generación, que permanecían activos en aguas duras y toleraban residuos aniónicos pero solo se usaba para limpieza de pisos y paredes. Los amonios cuaternarios en diluciones del 1 y 2 % se utilizan con frecuencia en la limpieza ambiental ordinaria de superficies no críticas, como pisos, muebles y paredes. No se recomienda para la sanitización de instrumental, debido a que se inactiva en presencia de materia orgánica, jabón y celulosa, ni para la antisepsia de la piel, porque forma una película debajo de la cual las bacterias se mantienen viables (Negromi, 2009).

6.6.1.1 Mecanismo de Acción de Compuestos de Amonio Cuaternario (CAC).

Presentan una fuerte actividad bactericida contra las bacterias grampositivas y son algo menos activos contra las bacterias gramnegativas, son fungicidas, amebicidas y virucidas contra virus envueltos, no destruyen las endosporas ni las Micobacterias. La acción bactericida de los amonios cuaternarios ha sido atribuida especialmente a la ruptura de la membrana, alterando la permeabilidad de la célula y provocando la pérdida de constituyentes citoplasmáticos esenciales como el potasio, inactivación de las enzimas



productoras de energía, la desnaturalización de las proteínas esenciales de la célula y ácidos nucleicos (Negromi, 2009).

Los compuestos de amonio cuaternario son esporoestáticos, inhiben el crecimiento excesivo de esporas (el desarrollo de una célula vegetativa a partir de una spora germinada), pero no los procesos de germinación reales (desarrollo de la latencia a un estado metabólicamente activo), aunque por un mecanismo desconocido. Del mismo modo, tienen una acción micobacterioestática, aunque los efectos reales sobre las micobacterias han sido poco estudiados (McDonnell, 1999).

6.6.2 Alcoholes.

Los Alcoholes son compuesto químicos solubles en agua, se utilizan con mayor frecuencia Alcohol etílico y Alcohol Isopropílico, la concentración optima recomendada es del 70%, también parece eliminar a los microorganismos las concentraciones de entre 60 y el 90%. La actividad de los alcoholes disminuye notablemente cuando se diluye por debajo del 50 % , estas concentraciones se pueden usar como conservantes y para potenciar la actividad de otros biocidas, mientras que las concentraciones mayores a 90% deshidratan a los microorganismos y los conservan en lugar de destruidos. Un inconveniente es que se evaporan rápidamente, lo que impide lograr un tiempo de exposición prolongado, el alcohol isopropílico es algo superior al etanol como antiséptico y sanitizante, además es menos volátil (Tortora, 2007).

6.6.2.1 Mecanismo de acción de Alcoholes.

En general, el alcohol isopropílico se considera ligeramente más eficaz contra las bacterias y el alcohol etílico es más potente contra el virus A sin embargo, esto depende de las concentraciones de tanto el agente activo y el microorganismo de ensayo. Por ejemplo, el alcohol isopropílico tiene mayores propiedades lipofílicas que el alcohol etílico y es menos activo contra los virus hidrófilos (por ejemplo, poliovirus) (McDonnell, 1999).



El mecanismo de acción se basa en el aumento de la eficacia en presencia de agua, en general se cree que causan daño a la membrana y una rápida desnaturalización de las proteínas por inhibición de la producción de metabolitos esenciales, alteraran las membranas y disuelven muchos lípidos, entre ellos el componente lipídico de los virus envueltos y se provoca lisis celular. Esta acción se cumple en presencia de agua y por ello se explica que el alcohol al 70% es más efectivo que al 95% (Negromi, 2009).

Los Alcoholes exhiben amplio espectro de actividad antimicrobiana como bactericidas rápidos, más que bacteriostáticos, sobre formas como las bacterias vegetativas (incluyendo micobacterias), virus sin envoltura y hongos, pero no son esporicidas. Sin embargo, se sabe que inhibe la esporulación y la germinación de las esporas, pero este efecto es reversible. Debido a la falta de actividad esporicida, los alcoholes no se recomiendan para la esterilización, pero son ampliamente utilizados tanto para la sanitización de superficies duras y la antisepsia de la piel (McDonnell, 1999).

6.6.3 Halógenos.

Los halógenos en particular el Cloro y compuestos a base de yodo son agentes antimicrobicidas eficaces tanto solos como en forma de ingredientes en compuestos inorgánicos u orgánicos y se han utilizado tradicionalmente para ambos propósitos antiséptico y sanitizante.

6.6.3.1 Yodo y Yodóforos.

El yodo es uno de los antisépticos más antiguos y más eficaces. Las soluciones de yodo se han utilizado durante 150 años como antisépticos, existen soluciones acuosas (Iugol) o alcohólicas (tintura), que están asociados con la irritación y tinción excesiva. Además, las soluciones acuosas son generalmente inestables, en solución, al menos siete especies de yodo están presentes en un equilibrio complejo, con yodo molecular (I_2) que es el principalmente responsable de la eficacia antimicrobiana. Estos problemas se superaron con el desarrollo de los yodóforos ("portadores de yodo" o "liberación de yodo-



agentes") que tienen la actividad antimicrobiana del yodo pero no manchan y son menos irritantes (McDonnell, 1999).

Un yodóforo es una combinación de yodo y una molécula orgánica, a partir de la cual el yodo se libera lentamente. Los Yodóforos más utilizados son el poloxámo y la povidona, la povidona se emplea como sanitizante de superficies, antiséptico de la piel y mucosas que mejora la acción humectante, actúa como un reservorio de yodo libre (Negromi, 2009).

6.6.3.1.1 Mecanismo de acción del Yodo y Yodóforos.

Aunque es menos reactivo que el cloro, el yodo es rápidamente bactericida, fungicida, tuberculocida, virucida y esporicida. El yodo penetra rápidamente en los microorganismos ataca a los principales grupos de proteínas (en particular, la cisteína libre de aminoácidos azufrados metionina), nucleótidos y ácidos grasos, que culmina en la muerte celular, altera las membranas celulares, al parecer por la formación de complejos con los aminoácidos y los ácidos grasos insaturados (Tortora, 2007). Aunque la actividad germicida se mantiene los yodóforos son considerados menos activos frente a ciertos hongos y esporas.

Se sabe menos sobre la acción antiviral de yodo, pero los virus no lipídicos y parvovirus son menos sensibles que los virus con envoltura de lípidos. De manera similar a las bacterias, es probable que el yodo ataca a las proteínas de superficie de los virus con envoltura, pero también pueden desestabilizar los ácidos grasos de la membrana mediante la reacción con enlaces de carbono insaturados (McDonnell, 1999).

6.6.3.2 Cloro y compuestos del cloro.

Los hipocloritos son los sanitizantes con cloro más utilizados, se comercializan en forma líquida (hipoclorito de sodio) y en forma sólida (hipoclorito de calcio). La acción microbicida es muy rápida, para establecer la relación entre concentración y dilución del cloro, la eficacia de la actividad sanitizante se reduce con el periodo de almacenamiento, con temperaturas elevadas y con la



exposición a la luz solar, la materia orgánica limita la acción cuando no hay abundante cloro disponible, es corrosivo a más de 0.5%.

Se ha sugerido el empleo de soluciones diluidas de hipoclorito para la sanitización de habitaciones de hospitales de pacientes con diarrea o colitis asociadas con *Clostridium difficile*, para evitar la propagación del microorganismo. Se utiliza como potabilizador de agua de consumo a 5mg /L (Negromi, 2009).

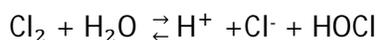
Las soluciones de hipoclorito de calcio [Ca(OCl)₂] se usan para sanitizar los equipos empleados para productos lácteos y los utensilios de cocina utilizados en restaurantes. Este compuesto, alguna vez llamado cloruro de cal, se utilizaba en 1852, para empapar la ropa de los hospitales y controlar las infecciones hospitalarias durante el parto (Tortora, 2007).

Una forma líquida de gas cloro comprimido se usa ampliamente para la sanitización del agua potable municipal, agua de piscinas y aguas residuales. El cloro como gas o en combinación con otras sustancias químicas, también se utiliza mucho como sanitizantes. Su acción germicida está determinada por el ácido hipocloroso (HOCl) que se forma cuando el cloro se agrega al agua.

6.6.3.2.1 Mecanismo de acción del Cloro.

El mecanismo de acción se basa en la inactivación de las reacciones enzimáticas, de ácidos nucleicos y desnaturalización de proteínas de las células bacterianas, interrumpe la fosforilización oxidativa. Es un agente oxidante fuerte que impide el funcionamiento del sistema enzimático celular, el ácido hipocloroso no disociado es la forma más eficaz del cloro porque es neutro respecto de su carga eléctrica y se difunde con igual rapidez que el agua a través de la pared celular. Debido a su carga negativa, el ion hipoclorito (OCl⁻) no puede entrar libremente a la célula. Esta disociación depende del pH, a medida que este aumenta la actividad microbicida disminuye.

El cloro en cualquiera de sus formas, se hidroliza al entrar en contacto con el agua, y forma ácido hipocloroso. En el caso del **cloro gaseoso**, la reacción que tiene lugar es:



En el caso del **hipoclorito de calcio** y la porción activa de la **cal clorada**, la reacción es:



La especie sanitizante es el ácido hipocloroso (HOCl), el cual se disocia en iones hidrogenios (H^+) e hipoclorito (OCl^-) y adquiere sus propiedades oxidantes:



Ácido hipocloroso ion hidrogeno ion hipoclorito

Ambas fracciones de la especie son microbicidas y actúan inhibiendo la actividad enzimática de las bacterias y virus y produciendo su inactivación. Tanto el ácido hipocloroso (HOCl) como el ión hipoclorito (OCl^-) están presentes hasta cierto punto, cuando el pH esta entre 4 y 7 el cloro existe predominantemente como HClO, la fracción activa, mientras que por encima de pH 9, OCl^- predomina.

6.6.3.3 Compuestos del Cloro.

Los tipos más importantes Agentes Liberadores de Cloro son hipoclorito de sodio, dióxido de cloro, y los compuestos de N-cloro tales como Dicloroisocianurato de Sodio (NaDCC), con cloramina-T que se utiliza en cierta medida.

El dióxido de cloro (ClO_2) es una forma gaseosa del cloro que a veces se utiliza para sanitizar zonas, principalmente para eliminar las endosporas de la bacteria causante del carbunco.

El hipoclorito de sodio NaOCl se emplea como blanqueador doméstico (Clorox) y como sanitizante en establecimientos de productos lácteos, de procesamiento de alimentos así como en los sistemas de hemodiálisis y para



superficies duras. Para incursiones militares proporcionaban comprimidos (Chlor- Foc) que contiene dicloroisocianurato de sodio, una forma de cloro combinada con un agente que floclula material en suspensión en una muestra de agua, lo que permite la separación y produce la clarificación del agua. Tiene las ventajas de proporcionar una mayor concentración de cloro disponible y es menos susceptible a la inactivación por materia orgánica (Negromi, 2009)

En el caso del **hipoclorito de sodio**, la reacción que tiene lugar es:



Las cloramidas, otro grupo de compuestos del cloro, están formadas por cloro y amoniacó. Se utilizan como agentes sanitizantes, antisépticos y higienizantes. Las cloraminas son compuestos muy estables que liberan cloro durante periodos prolongados. Son relativamente eficaces en la materia orgánica pero tienen la desventaja de actuar con más lentitud y de ser purificadores menos eficaces que muchos otros compuestos de cloro. Se emplean para higienizar la cristalería y los utensilios de cocina y para tratar los equipos utilizados en la elaboración industrial de productos lácteos y de alimentos. El amoniacó suele mezclarse con el cloro en los sistemas de tratamiento de aguas municipales para formar cloraminas, estas controlan los problemas de sabor y de olor causados por la reacción del cloro con otros compuestos nitrogenados del agua. Dado que las cloraminas son menos eficaces como bactericidas, debe agregarse suficiente cloro para asegurar un residuo de cloro en la forma de HOCl, Asimismo, se forman el ácido clorhídrico (HCl) y los hidróxidos de calcio y sodio, los cuales no participan en el proceso de sanitización (Tortora, 2007).

6.6.3.3.1 Mecanismo de acción de los compuestos del Cloro.

Agentes liberadores de Cloro son agentes oxidantes altamente activos y con ello destruir la actividad celular de proteínas; potenciación de la oxidación se puede producir a bajo pH, en donde la actividad es máxima y se logra la mayor penetración de las capas externas de las células, implican la formación de derivados clorados de bases de nucleótidos en el ADN bacteriano.



El OCl^- ion tiene un efecto mínimo en comparación con disolver HOCl. Esto se correlaciona con la observación de que la actividad de los Agentes Liberadores de Cloro es mayor cuando el porcentaje de HOCl no disuelto es más alto. Este concepto se aplica a los hipocloritos, Dicloroisocianurato de Sodio (NaDCC) y cloramina-T. El dióxido de cloro inhibe la síntesis de proteínas bacteriana (McDonnell, 1999).

En concentraciones más altas son esporicidas; esto depende del pH y de la concentración de cloro disponible. Durante el tratamiento, las esporas pierden refractividad, la capa de la espora se separa de la corteza, y se produce la lisis. Además, un número de estudios han llegado a la conclusión que los Agentes Liberadores de Cloro tratados con esporas presentan un aumento de la permeabilidad de la capa de la espora.

6.6.4 Peróxidos.

6.6.4.1 Peróxido de hidrogeno.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un biocida ampliamente utilizado para la sanitización, esterilización y antisepsia. Es un líquido claro, incoloro, que está disponible comercialmente en una variedad de concentraciones que van de 3% a 90% (McDonnell, 1999). En solución al 3% su acción es limitada por la presencia de materia orgánica e inhibida por la catalasa de las bacterias y los tejidos. El peróxido de hidrogeno es útil en la antisepsia de las heridas y elimina mecánicamente restos de tejidos y microorganismos atrapados en ellas por el burbujeo que genera la liberación de oxígeno (Negromi, 2009).

6.6.4.1.1 Mecanismo de acción del Peróxido de hidrogeno.

El peróxido de hidrogeno demuestra eficacia de amplio espectro contra virus, bacterias, levaduras, y las esporas bacterianas. En general, la mayor actividad se ve contra bacterias grampositivas que contra bacterias gramnegativas, sin embargo, la presencia de enzimas como peroxidasas o catalasas en los microorganismos puede aumentar la tolerancia en presencia de concentraciones más bajas. Mayores concentraciones de H_2O_2 (10% a 30%) y



tiempos de contacto más largos son necesarios para la actividad esporicida, aunque esta actividad es significativamente mayor en la fase gaseosa.

El peróxido de hidrogeno actúa como un oxidante mediante la producción de radicales libres hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), que atacan los componentes esenciales celulares, incluyendo los lípidos, proteínas y ADN, se ha propuesto que particularmente están dirigidos a grupos sulfhidrilo y enlaces dobles (McDonnell, 1999). Sin embargo, en la mayoría de las células, los radicales hidroxilo son sólo formas transitorias, porque la fuente principal de $\cdot\text{OH}$ son las radiaciones ionizantes a las que las células normales se encuentran expuestas. Se forman pequeñas cantidades de $\cdot\text{OH}$ a partir del peróxido de hidrogeno (H_2O_2), pero como los peróxidos no se acumulan en la célula (debido a la acción de la catalasa) esta fuente de radicales hidroxilo prácticamente se elimina, también el peróxido se destruye mediante la enzima peroxidasa que requiere de un reductor NADH para originar H_2O como producto. (Brook, 2004)

6.6.4.2 Ácido peracético.

El ácido peracético (CH_3COOOH) se considera un biocida más potente que el peróxido de hidrógeno. Su principal aplicación es como un esterilizante líquido a baja temperatura para los dispositivos médicos, endoscopios flexibles y hemodializadores, pero también se utiliza como un esterilizador de superficie del medio ambiente.

6.6.4.2.1 Mecanismo de acción del Ácido peracético.

Es esporicida, bactericida, virucida, y fungicida a bajas concentraciones (<0,3%). Se descompone en productos seguros (ácido acético y oxígeno), pero tiene las ventajas adicionales de ser libre de la descomposición por peroxidasa, a diferencia de H_2O_2 , y que permanecen activas en la presencia de cargas orgánicas.

Al igual que en H_2O_2 , el ácido peracético probablemente desnatura las proteínas y enzimas, aumenta la permeabilidad de la pared celular mediante la interrupción de enlaces sulfhidrilo ($-\text{SH}$) y azufre ($\text{S}-\text{S}$) (McDonnell, 1999).



6.6.5 Fenol y derivados fenólicos.

6.6.5.1 Fenol.

El fenol ha ocupado un lugar prominente en el campo de la sanitización hospitalaria desde que Lister lo utilizó por primera vez. En la actualidad rara la vez se utiliza como antiséptico o sanitizante debido a los efectos irritantes sobre la piel y a su olor desagradable (Tortora, 2007).

Existen muchos derivados del fenol: los alquilfenoles (timol, cresol, xilenol), los bifenoles (triclosan), nitrofenoles (ácido pícrico), fenolsalicílicos (ácido salicílico), fenoles con halógenos (hexaclorofeno) y polifenoles (resorcina, guayacol). Uno de los compuestos fenólicos más utilizados con más frecuencia deriva del alquitran y forma parte de un grupo de sustancias químicas denominadas cresoles. Un cresol muy importante es el O-fenilfenol componente de Lysol™.

El cresol (tricresol) Es una mezcla de los tres isómeros (orto, meta y para), con predominio del meta. Es hasta 10 veces más potente que el fenol y muy irritante, por lo que sólo se emplea como sanitizante para uso hospitalario y doméstico en solución jabonosa al 50% (Font, 2001).

6.6.5.1.1 Mecanismo de acción del Fenol.

El fenol provoca fuga progresiva de los componentes intracelulares, incluyendo la liberación de K^+ , destruyen la pared y la membrana celulares que contienen lípidos, lo que determina la pérdida del contenido celular. La pared celular de las micobacterias tiene gran cantidad de lípidos, lo que las convierte en susceptibles a estos derivados. También inactivan los sistemas enzimáticos (Negromi, 2009).

Es bactericida (1.5%, aproximadamente) y bacteriostático a menores concentraciones (entre el 0.02% -1%), actuando también frente algunos hongos y virus, pero no tiene acción sobre esporas (Font, 2001).



6.6.5.2 Derivados Fenólicos.

Los derivados del fenol, denominados fenólicos, contienen una modificación química para reducir sus cualidades irritantes o para aumentar su actividad antibacteriana en combinación con un jabón o un detergente (Tortora, 2007). Las propiedades antimicrobianas de estos derivados superan a las del fenol, también se combinan con cloro para tratar superficies. Permanecen activos en presencia de compuestos orgánicos, son estables y persisten durante períodos prolongados después de su aplicación. Son agentes adecuados para sanitizar pus, saliva y heces (Negromi, 2009).

En la actualidad existen diversas marcas comerciales, por mencionar algunas están los sanitizantes que se evalúan en este proyecto: Process LpH st® y Vesphene Ilist® que son derivados fenólicos que tienen como principal activo el o-fenilfenol. De acuerdo con el proveedor la formulación es utilizada específicamente para su uso en superficies duras, no porosas y para proporcionar eficacia probada contra un amplio espectro de microorganismos sin dañar los materiales de superficie comunes. La formulación contiene tensioactivos para mejorar la eficacia de la sanitización y ayudar en el rendimiento de limpieza. En un programa de rotación de sanitizantes resulta ideal ser utilizada la formulación alcalina de Process Vesphene Ilist® con la formulación de medio ácido Process LpH st®.

6.6.5.2.1 Mecanismo de acción de los Derivados Fenólicos.

Los compuestos fenólicos tienen propiedades antifúngicas y antivirales. Su acción antifúngica probablemente involucra el daño de la membrana plasmática, dando lugar a fugas de los componentes intracelulares. Ejercen su actividad antimicrobiana al lesionar las membranas plasmáticas que contienen lípidos, lo que determina la pérdida del contenido celular. Permanecen activos en presencia de compuestos orgánicos, son estables y persisten durante períodos prolongados después de su aplicación (McDonnell, 1999).

6.6.5.2.2 Bisfenoles.

Los bisfenoles son derivados del fenol que contienen dos grupos fenólicos unidos por un puente (Tortora, 2007).



6.6.5.2.2.1 Mecanismo de acción de los Bisfenoles.

Los bisfenoles en general, exhiben eficacia de amplio espectro pero tienen poca actividad frente a *P. aeruginosa* y son esporoestáticos hacia las esporas bacterianas. Afecta las actividades metabólicas de *S. aureus* y *E. coli*, produce un aumento selectivo de la permeabilidad a los protones con una disipación consiguiente de la fuerza motriz de protones (PMF) y un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (McDonnell, 1999).

6.6.5.2.3 Hexaclorofeno.

El hexaclorofeno (2,2'-dihidroxi-3,5,6,3',5',6'-hexaclorodifenilmetano) es un bisfenol cuyo modo de acción ha sido ampliamente estudiado, es bactericida de amplio espectro, es un componente de una loción recetada, utilizada para el control microbiano de procedimientos quirúrgicos y hospitalarios. Los estafilococos y los estreptococos grampositivos, que pueden causar infecciones cutáneas en recién nacidos, son particularmente susceptibles al hexaclorofeno, de modo que se utiliza con frecuencia para controlar estas infecciones en las salas de neonatología. Sin embargo, el uso excesivo de este bisfenol puede conducir a lesiones neurológicas (Tortora, 2007).

6.6.5.2.3.1 Mecanismo de acción del Hexaclorofeno.

La acción primaria de hexaclorofeno, basado en estudios con *Bacillus megatherium*, es inhibir la parte unida a la membrana de la cadena de transporte de electrones, y los otros efectos mencionados arriba son los secundarios que se producen sólo a altas concentraciones. Se induce la fuga, provoca la lisis de protoplastos, e inhibe la respiración (McDonnell, 1999).

6.6.5.2.4 Triclosán.

Otro bisfenol que se utiliza mucho es triclosán un componente de los jabones antibacterianos y al menos de una pasta dentífrica. El triclosán ha sido incorporado incluso en tablas de cocina para cortar, en los mangos de los cuchillos y otros utensilios de cocina de plástico. Hoy su uso está tan difundido que ya han informado bacterias resistentes, lo que ha creado preocupaciones acerca de su efecto sobre la resistencia de los microbios a ciertos antibióticos.



6.6.5.2.4.1 Mecanismo de acción del Triclosán.

El triclosán inhibe una enzima necesaria para la biosíntesis de ácidos grasos (lípidos) que afecta sobre todo la integridad de la membrana plasmática. Especialmente muestra una actividad particular eficaz contra las bacterias grampositivas, la eficacia contra los hongos y las bacterias gramnegativas puede ser significativamente mejorada por efectos de la formulación, hay ciertas excepciones como *Pseudomona aeruginosa*, una bacteria gramnegativa que es muy resistente al triclosán (Tortora, 2007).

El modo de acción específico de triclosán es desconocido, pero se ha sugerido que los efectos primarios están en la membrana citoplasmática. En estudios el triclosán a concentraciones subinhibitorias inhibe la absorción de nutrientes esenciales, mientras que a mayores concentraciones bactericidas, dio como resultado la rápida liberación de los componentes celulares y muerte celular. Se propuso que los iones divalentes y ácidos grasos pueden adsorber y limitar la permeabilidad de triclosán a su sitio de acción (McDonnell, 1999).

6.6.6 Aldehídos.

Los aldehídos se encuentran entre los antimicrobianos más eficaces. Dos ejemplos son el formaldehído y el glutaraldehído. El formaldehído gaseoso es un sanitizante excelente. Sin embargo, se utiliza con más frecuencia como formol, una solución acuosa de formaldehído al 37%. En otros tiempos el formol se utilizaba para conservar muestras biológicas, embalsamar cadáveres e inactivar bacterias y virus en la preparación de vacunas (Tortora, 2007).

6.6.6.1 Mecanismo de acción de los Aldehídos.

Inactivan las proteínas mediante la formación de enlaces covalentes entre varios grupos funcionales (-NH₂, -OH, -COOH y -SH).

6.6.6.2 Formaldehído o Formol.

El formaldehído es un monoaldehído que existe como un gas libremente soluble en agua. Solución de formaldehído (formalina) es una solución acuosa que contiene 34% - 38% (peso / peso) asociado con metanol para evitar su



polimerización y su conversión a estado sólido. Su uso clínico es generalmente como sanitizante y esterilizante en forma líquida o en combinación con vapor de baja temperatura (McDonnell, 1999). Su actividad aumenta si se prepara en solución alcohólica y al elevar la temperatura, su pH óptimo se encuentra entre 6 y 8.

Es incompatible con agentes oxidantes, fenoles, amoníaco, álcalis y sales de metales pesados. Normalmente se emplea como sanitizante ya que como antiséptico resulta irritante y en ocasiones produce reacciones de sensibilización (dermatitis alérgica), además la inhalación de vapores irrita los ojos, nariz y vías respiratorias (Font, 2001).

El formol es un sanitizante que puede ser esterilizante tanto en su estado líquido como gaseoso. La solución de formol con base de agua se conoce como formalina (contiene 37% de formol por peso). Hay instituciones que recomiendan que el formol no se utilice en el lugar de trabajo debido a su potencial cancerígeno. Se ha fijado el tiempo máximo que el personal debería exponerse a esos vapores (Negromi, 2009).

6.6.6.2.1 Mecanismo de acción del Formaldehído o Formol.

El formol alquila las proteínas, lo que conduce al cese de la actividad enzimática. Inactiva toxinas y virus sin afectar la antigenicidad (Negromi, 2009). El formaldehído Es un bactericida de acción lenta, es eficaz frente a formas vegetativas de hongos, bacterias y algunos virus. Posee baja actividad frente a formas esporuladas de bacterias (Font, 2001). Funciona más lentamente que el glutaraldehído, es muy reactivo que interactúa con la proteína, ADN, y el ARN. Durante mucho tiempo se ha considerado como esporicida en virtud de su capacidad de penetrar en el interior de las esporas bacterianas. La interacción con los resultados de proteína de una combinación con la amida primaria, así como con los grupos amino, aunque los grupos de fenol formaldehído se unen poco. Se ha propuesto como un agente mutagénico y como un agente alquilante, por reacción con grupos carboxilo, sulfhídrido, hidroxilo. El formaldehído también reacciona intensamente con ácido nucleico, inhibiendo la

síntesis de ADN. Las bajas concentraciones de formaldehído son esporoestáticos e inhiben la germinación (McDonnell, 1999).

6.6.6.3 Glutaraldehído.

El glutaraldehído es un dialdehído importante que ha encontrado uso como sanitizante y esterilizante, es menos irritante (aunque también puede provocar reacciones de sensibilización) y desprende menos vapores. Sus aplicaciones son al 2% ligeramente alcalinizado con bicarbonato sódico para sanitizar material sanitario que no resiste la esterilización por calor como endoscopios, material quirúrgico y equipos de respiración asistida. Su máxima actividad es a un pH de 7.5-8.5, lo que hay que tener en cuenta es la posible polimerización del producto, porque en estas condiciones se bloquean las partes activas (grupos aldehídos) responsables de su actividad biocida (Font, 2001).

En los últimos años se han producido nuevos compuestos de glutaraldehído (el glutaraldehidofenato, glutaraldehído ácido potenciado y el glutaraldehído alcalino estabilizado) .Se comercializa en solución al 25% y a pH ácido por ser más estable pero menos efectivo como sanitizante, por lo tanto al formular se debe neutralizar con bicarbonato sódico para alcanzar el pH óptimo (Negromi, 2009).

Es uno de los pocos sanitizantes líquidos que puede ser considerado agente esterilizante. Un sustituto posible del glutaraldehído para muchos usos es el orto- ftalaldehído (OPA) que es más eficaz contra muchos microorganismos y tiene menos propiedades irritantes (Tortora, 2007).

6.6.6.3.1 Mecanismo de acción del Glutaraldehído.

El glutaraldehído posee un amplio espectro de actividad contra las bacterias grampositivas, gramnegativas y sus esporas (esterilizante químico), hongos, virus, los bacilos ácido-alcohol resistentes, de acuerdo con la bibliografía internacional, no actúa sobre priones. Se cree que afecta a la pared celular de las micobacterias, inhibe los procesos de transporte en la célula, hay una fuerte asociación con capas externas de bacterias grampositivas y gramnegativas, presenta reticulación de grupos amino en proteínas. Las bajas concentraciones inhiben la germinación de las esporas bacterianas; a altas concentraciones



son esporicidas, probablemente como consecuencia de la fuerte interacción con las capas externas de las células y ataca la pared celular fúngica por la interacción con la quitina.

6.6.6.4 O-ftalaldehído.

OPA es un nuevo tipo de sanitizante que se afirma que tienen una potente actividad bactericida y esporicida y se ha sugerido como un reemplazo de glutaraldehído en la sanitización del endoscopio. OPA es un compuesto aromático con dos grupos aldehído.

El mecanismo de su acción antimicrobiana se ha estudiado poco, pero la evidencia preliminar sugiere una acción similar a la de glutaraldehído (McDonnell, 1999).

7. Diseño Experimental.

7.1 Materiales y equipos.

➤ Material no estéril

- Micropipetas 10 – 1000 μ L Gibson
- Propipeta
- Asa bacteriológica
- Mechero de bunsen
- Gradillas
- Frascos de vidrio con tapón de rosca de 1L
- Probeta de 10 mL
- Probeta de 100 mL
- Probeta 1000 mL
- Atomizador
- Cronómetro

➤ Material estéril

- Botella para Roux con Agar Soya Trypticaseína (AST)
- Botella para Roux con Agar Dextrosa Sabouraud (ASD)
- Tubos de ensaye de vidrio con tapón de rosca de 25 x 200 mm
- Tubos de ensaye de vidrio con tapón de rosca de 18 x 150 mm



- Cajas petri vacías
- Cajas petri con Agar Nutritivo
- Cajas de petri con Agar Soya Trypticaseína (AST)
- Puntas para micropipeta
- Pipetas de 10 mL
- Perlas de Vidrio
- Matraces Erlenmeyer de 2 L
- Embudo de filtración rápida
- Frascos de vidrio con tapa
- Pinzas
- Tijeras
- Hisopos

➤ **Equipo**

- Vortex Genie 2
- Parrilla con agitador. Marca VWR.
- Baño de agua María. Marca Blue M. Modelo MW-1130A1
- Incubadora Industrial. Marca Figursa 30 – 35° C. Modelo IFD-180.
- Incubadora Industrial. Marca Figursa 35 – 37° C. Modelo IFD-10042.
- Refrigerador. Marca Revco. Modelo REL1204A21
- Balanza Analítica. Marca Mettler Toledo . Modelo IFD-180
- Potenciómetro

➤ **7.2 Superficies de prueba.**

- Acero inoxidable Inox 314
- Piso con recubrimiento epóxico
- Plástico cristal

➤ **7.3 Sanitizantes Evaluados.**

- Process Vesphene Ilist. STERIS®
- Process LpH st. STERIS®
- Alcohol Isopropílico 70%
- Cloro 4 %



7.4 Material biológico, medios de cultivo y soluciones.

➤ Material biológico.

Los microorganismos de prueba utilizados para la evaluación de los sanitizantes in situ son cepas provenientes de MicroBiologics™ y fueron los siguientes:

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	ATCC 6633
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11229
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SIN ATCC ¹

¹ Esta cepa fue aislada del Monitoreo ambiental.

➤ Medios de Cultivo.

- Agar nutritivo. DIBICO® CAT. 1022-E
- Agar para Métodos Estándar. Becton Bioxon ® CAT. 21174
- Agar Soya Trypticaseína (AST). MERCK® CAT. 1.05458.0500
- Agar Dextrosa Sabouraud (ADS). DIBICO® CAT. 1007-E

La preparación de los medios de cultivo se encuentra descrita en el **anexo I**.

➤ Soluciones.

- Solución salina estéril al 0.85 % NaCl.
- Solución neutralizante estéril.
- Solución de tiosulfato de sodio estéril al 15%.
- Solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M estéril.

La preparación de las soluciones se encuentra descritas en el **anexo I**.



➤ 7.5 Metodología.

7.5.1 Preparación de las suspensiones de cada microorganismo de prueba. Se tomó como referencia el método “Evaluación de sanitizantes” **ME.M93.2MTP.00002.**

7.5.1.1 Preparación de la Suspensión de los Microorganismos de prueba no esporulados. (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*).

Se sembró por estría cada cepa en tubos de vidrio de 18 x 150 mm conteniendo éstos 10 mL de Agar Nutritivo inclinado se incubo a 35 – 37 °C de 20 a 24 Horas. Se suspendió el crecimiento obtenido en cada uno de los tubos con 5 mL de Solución Salina estéril y se inocula cada uno en botellas de Roux conteniendo 250 mL de Agar Nutritivo se incubo a 35– 37 °C de 20 a 24 Horas.

Se cosecho el crecimiento de cada microorganismo en las botellas con una cantidad aproximada de 15 mL de Solución Salina estéril y se colocó la suspensión en tubos de vidrio estériles con tapa de 25 x 200 mm. Se realizó diluciones decimales (1:10) de cada Suspensión de cepa hasta 10^{-9} con solución de Solución Salina estéril, se agito por 15 segundos entre cada dilución. Se efectuó la cuenta bacteriana por el método de vaciado en placa con Agar para Métodos Cuenta Estándar por duplicado, a las diluciones 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} . Se incubo a 35 – 37 °C de 20 a 24 Horas. Después de la incubación se contó las colonias por caja por dilución.

7.5.1.2 Preparación de la suspensión de esporas del microorganismo de prueba *Bacillus subtilis subespecie spizizenii*.

Se inoculo en una placa o tubo de Agar Soya Trypticaseína y se incubo a 30-35°C de 18-24 h. Se lavó la placa o tubo con aproximadamente 3 mL de agua purificada estéril. Se inocula esta suspensión dentro de una botella de Roux con 250 mL de Agar Soya Trypticaseina. Se incubo la botella a 30-35°C de 7-14 días y se resuspendió el crecimiento obtenido con solución Salina estéril.



Después de aproximadamente 3 horas de agitación se pasó esta suspensión a través de una gasa estéril y se calentó a 70°C por 30 minutos. Se detuvo el choque térmico al ponerlo en refrigeración. Se realizaron cuentas bacterianas por el método de vaciado en placa con Agar para Métodos Cuenta Estándar por duplicado. Se incubó a 35– 37 °C de 20 a 24 Horas. Después de la incubación se contó el número de colonias.

7.5.1.3 Preparación de la suspensión de esporas del microorganismo de prueba *Aspergillus brasiliensis*.

Se inoculó una botella de Roux con 250 mL de Agar Dextrosa Sabouraud y se incubó a 20-25°C por 7-10 días y se adicionó 10-15 mL de solución salina 0.9% adicionada de polisorbato 80 al 0.05%, se adicionaron perlas de vidrio estériles y se homogenizó para remover las esporas. Se realizaron cuentas microbianas para determinar la concentración de esporas por el método de vaciado en placa con Agar para Métodos Cuenta Estándar por duplicado. Se incubó a 35 – 37 °C de 48 a 72 Horas. Después de la incubación se contó el número de colonias.

7.5.2 Superficies de prueba.

Se evaluó cada uno de los siguientes materiales de las áreas de fabricación (fig.2) : acero inoxidable, piso epóxico, plástico cristal (utilizado para cortinas de los módulos de flujo laminar), cada material de prueba se retó con tres lotes de cada uno de los sanitizantes evaluados.

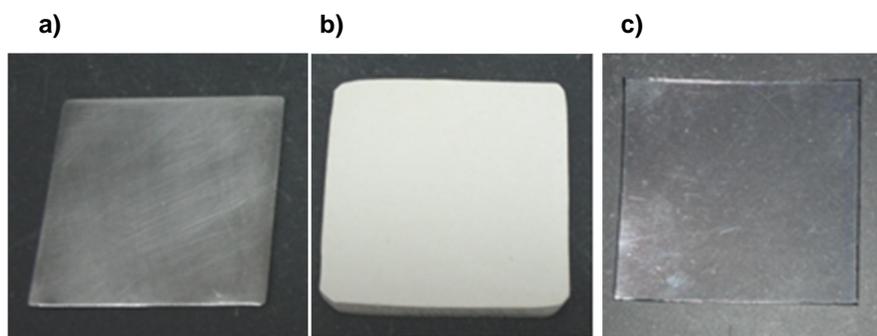


Fig.2 Superficies de prueba: a) Acero inoxidable. b) Piso epóxico. c) Plástico cristal.



7.5.3 Procedimiento de la Evaluación in situ.

La prueba fue realizada tomando como referencia el procedimiento **ME.M93.2MTP.00002 “Evaluación de Sanitizantes”**. Para evaluar la efectividad de los sanitizantes con cada una de los microorganismos de prueba.

Se prepararon los sanitizantes: **Process Vesphene Iist. STERIS®**, **Process LpH st. STERIS®**, **Alcohol Isopropílico 70%**, **Cloro 4 %** de acuerdo al procedimiento **“Limpieza y Sanitización para las Áreas de Fabricación” ME.F93.3SOP2.0006**. Se distribuyeron en porciones de 1L en atomizadores.

Para la evaluación del sanitizante se utilizó un cuadrado de 2 pulgadas x 2 pulgadas del material de prueba, como lo indica la USP, al cual se le colocó 1 mL de una suspensión de uno de los cinco microorganismos de prueba (***E.coli***, ***S.aureus***, ***S.epidermidis***, ***B. spizizenii***, ***A.niger***), se distribuyó con un asa microbiológica para cubrir toda la superficie del material de prueba. Se colocó el material de prueba por un periodo de una hora en la estufa a 35 – 37 °C para permitir que los microorganismos se adhirieran a la superficie (Fig. 3A), una vez transcurrido el tiempo, se retiró de la estufa y se procedió a la aspersion con el sanitizante hasta cubrir la superficie y se acciono el cronómetro (Fig. 3B). Transcurrida una hora de contacto del sanitizante con la superficie de prueba, inmediatamente se procedió a la recuperación de los microorganismos sobrevivientes del material de prueba lavando la superficie del material con 4 mL de solución neutralizante diluida estéril, con ayuda de unas pinzas estériles se remojo el material de prueba y con un hisopo estéril se froto la superficie del material de prueba para recuperar los microorganismos sobrevivientes adheridos y se recuperó en un tubo ,se dejó dentro el hisopo que se utilizó cortándolo con tijeras estériles, se homogenizo con ayuda del vortex y se realizaron diluciones decimales (1: 10) con tubos con 9 ml de solución neutralizante diluida estéril y se procedió a realizar vertido en placa con Agar cuenta estándar con solución neutralizante para el recuento de los microorganismos sobrevivientes en cada prueba por duplicado. Se Incubo a 35° - 37°C por 48 horas. Se utilizó como método **“Cuenta Microbiana. Técnica de Cuenta en placa” ME.M90.2MTP.05215** y se determinó la



concentración de las células sobrevivientes en UFC en el material de prueba (este es el valor de S), se consideró las diluciones realizadas.

Para el caso del sanitizante Cloro 4% se realizó el lavado de la superficie del material con 4 mL de solución de tiosulfato de sodio 15 % para neutralizar el Cloro y se continuó con el procedimiento.

Este procedimiento se repite hasta evaluar cada uno de los tres lotes de sanitizante con cada uno de los cinco microorganismos de prueba y se repite hasta completar las diferentes superficies de prueba: acero inoxidable, piso con recubrimiento epóxico, plástico cristal (se utiliza para cortinas de los módulos de flujo laminar).

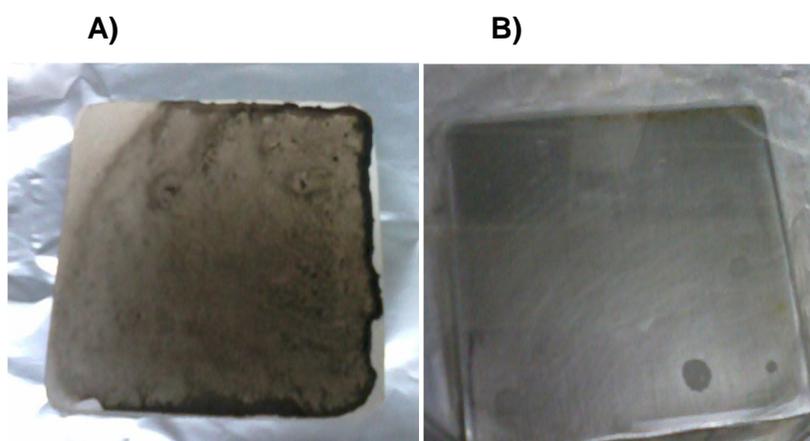


Fig. 3 A) Secado de la superficie de prueba con *A. niger*. B) Acción del Sanitizante Cloro 4% sobre Acero inoxidable contaminada con *A. niger*.

7.5.3.1 Cuenta Control.

Se utilizó un cuadrado de 2 pulgadas x 2 pulgadas de una de las superficies de prueba, como se indica en la USP, al cual se le colocó 1 ml de una suspensión de uno de los cinco microorganismos de prueba (*E.coli*, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *B. spizizenii*, *A.niger*), se distribuyó con un asa microbiológica para cubrir toda la superficie del material de prueba. Se colocó el material de prueba por un periodo de una hora en la estufa a 35 – 37 °C para permitir que los microorganismos se adhirieran a la superficie, una vez transcurrido el tiempo, se retiró de la estufa y se recuperó los microorganismos del material de prueba mediante lavado utilizando 4 mL de solución neutralizante diluida



estéril, con ayuda de unas pinzas estériles se remojo el material de prueba y con un hisopo estéril se froto la superficie del material de prueba para recuperar los microorganismos sobrevivientes adheridos y se recuperó en un tubo ,se dejó dentro el hisopo que se utilizó cortándolo con tijeras estériles, se homogenizo con ayuda del vortex y se procedió a realizar el conteo microbiano mediante el método “**Cuenta Microbiana. Técnica de Cuenta en placa**” **ME.M90.2MTP.05215**, para lo cual se realizaron diluciones decimales (1:10) con tubos con 9 mL de solución neutralizante diluida estéril hasta 10^{-8} , se colocó en cajas petri estériles y por duplicado 1 ml de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} , se realizó vertido en placa con Agar para Métodos Estándar y se Incubo a 35° - 37° C por 48 horas. Para el caso de *Aspergillus niger* se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-6} y se colocó en cajas petri estériles y por duplicado 1 ml de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} se Incubo a 35° - 37° C por 48 horas. Después del periodo de incubación se determinó la concentración del inóculo en UFC en la superficie de prueba, esta será la cuenta viable inicial (el valor C.V.).

Este procedimiento se realizó para cada uno de los microorganismos de prueba (*E.coli*, *S.aureus*, *S.epidermidis*,*B. spizizenii*, *A.niger*) y para cada superficie de prueba (acero inoxidable, piso con recubrimiento epóxico, plástico cristal (se utiliza para cortinas de los módulos de flujo laminar).

8. Resultados.

Se evaluó la reducción de la biocarga expuesta al sanitizante en relación porcentual con respecto a la cuenta control de la cepa en cuestión efectuada al día de la evaluación.

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

Dónde:

S = Células sobrevivientes UFC

C.V.= Cuenta viable inicial UFC



Criterios de aceptación.

La prueba se considera válida si:

- Se logra el 99.999% de reducción de la biocarga expuesta en 1 hora de contacto con el material de prueba para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*.
- Si cumple el sanitizante con el punto anterior puede ser empleado de lo contrario se rechaza el uso del sanitizante.

En las siguientes Tablas se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la efectividad antimicrobiana del sanitizante **Process Vesphene Ilist®** en el material de prueba **Acero inoxidable**:

Fecha de análisis: 12- DIC-12

Material o superficie de prueba: Acero Inoxidable.

Lote: 1

Tabla 4. Evaluación del sanitizante Process Vesphene Ilist® .

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	224x10 ⁵	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	724x10 ⁷	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	452x10 ⁷	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	72x10 ⁵	168x10 ⁴	76.667
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	340x10 ⁷	188x10 ⁷	44.706

Fecha de análisis: 12- DIC-12

Material o superficie de prueba: Acero Inoxidable.

Lote: 2

Tabla 5. Evaluación del sanitizante Process Vesphene Ilist ®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	224x10 ⁵	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	724x10 ⁷	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	452x10 ⁷	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	72x10 ⁵	172x10 ⁴	76.111
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	340x10 ⁷	176x10 ⁷	48.235

Fecha de análisis: 12- DIC-12

Material o superficie de prueba: Acero Inoxidable.

Lote: 3

Tabla 6. Evaluación del sanitizante Process Vesphene Ilist ®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	224x10 ⁵	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	724x10 ⁷	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	452x10 ⁷	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	72x10 ⁵	176x10 ⁴	75.556
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	340x10 ⁷	188x10 ⁷	44.706

En las siguientes Tablas se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la efectividad antimicrobiana del sanitizante **Process Vesphene Ilist®** en el material de prueba **Piso**:

Fecha de análisis: 16- ENE-13

Material o superficie de prueba: Piso.

Lote: 1

Tabla 7. Evaluación del sanitizante Process Vesphene Ilist®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	120x10 ⁵	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	152x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	264x10 ⁶	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	88x10 ⁵	148x10 ⁴	83.182
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	716x10 ⁷	264x10 ⁷	63.128



Fecha de análisis: 16- ENE-13

Material o superficie de prueba: Piso.

Lote: 2

Tabla 8. Evaluación del sanitizante Process Vespene Ilist ®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	120x10 ⁵	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	152x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	264x10 ⁶	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	88x10 ⁵	164x10 ⁴	81.364
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	716x10 ⁷	254x10 ⁷	64.246

Fecha de análisis: 16- ENE-13

Material o superficie de prueba: Piso.

Lote: 3

Tabla 9. Evaluación del sanitizante Process Vespene Ilist ®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	120x10 ⁵	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	152x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	264x10 ⁶	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	88x10 ⁵	156x10 ⁴	82.273
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	716x10 ⁷	260x10 ⁷	63.687

En las siguientes Tablas se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la efectividad antimicrobiana del sanitizante **Process Vespene Ilist** en el material de prueba **Plástico**:

Fecha de análisis: 28- ENE-13

Material o superficie de prueba: Plástico.

Lote: 1

Tabla 10. Evaluación del sanitizante Process Vespene Ilist ®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	112x10 ⁵	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	608x10 ⁷	164x10 ²	99.999
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	196x10 ⁷	104x10 ²	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	232x10 ⁵	96x10 ⁴	95.862
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	920x10 ⁷	296x10 ⁷	67.826



Fecha de análisis: 28- ENE-13

Material o superficie de prueba: Plástico.

Lote: 2

Tabla 11. Evaluación del sanitizante Process Vesphene Ilist ®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	112x10 ⁵	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	608x10 ⁷	156x10 ²	99.999
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	196x10 ⁷	984x10 ¹	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	232x10 ⁵	100x10 ⁴	95.590
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	920x10 ⁷	296x10 ⁷	67.826

Fecha de análisis: 28- ENE-13

Material o superficie de prueba: Plástico.

Lote: 3

Tabla 12. Evaluación del sanitizante Process Vesphene Ilist ®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	112x10 ⁵	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	608x10 ⁷	164x10 ²	99.999
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	196x10 ⁷	952x10 ¹	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	232x10 ⁵	112x10 ⁴	95.172
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	920x10 ⁷	308x10 ⁷	66.523



En las siguientes Tablas se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la efectividad antimicrobiana del sanitizante **Process LpH st®** en el material de prueba **Acero inoxidable**:

Fecha de análisis: 19- DIC-12

Material o superficie de prueba: Acero inoxidable.

Lote: 1

Tabla 13. Evaluación del sanitizante Process LpH st ®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	520x10 ⁷	780x10 ²	99.999
<i>Escherichia coli</i>	108x10 ⁷	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	984x10 ⁶	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	48x10 ⁵	84x10 ⁴	82.500
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	664x10 ⁷	140x10 ⁷	78.916

Fecha de análisis: 19- DIC-12

Material o superficie de prueba: Acero inoxidable.

Lote: 2

Tabla 14. Evaluación del sanitizante Process LpH st ®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	520x10 ⁷	764x10 ²	99.999
<i>Escherichia coli</i>	108x10 ⁷	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	984x10 ⁶	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	48x10 ⁵	76x10 ⁴	84.167
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	664x10 ⁷	144x10 ⁷	78.313

Fecha de análisis: 19- DIC-12

Material o superficie de prueba: Acero inoxidable.

Lote: 3

Tabla 15. Evaluación del sanitizante Process LpH st ®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	520x10 ⁷	760x10 ²	99.999
<i>Escherichia coli</i>	108x10 ⁷	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	984x10 ⁶	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	48x10 ⁵	84x10 ⁴	82.500
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	664x10 ⁷	144x10 ⁷	78.313



En las siguientes Tablas se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la efectividad antimicrobiana del sanitizante **Process LpH st®** en el material de prueba **Piso**:

Fecha de análisis: 21- ENE-13

Material o superficie de prueba: Piso.

Lote: 1

Tabla 16. Evaluación del sanitizante Process LpH st ®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	580x10 ⁷	164x10 ¹	99.999
<i>Escherichia coli</i>	536x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	448x10 ⁷	752x10 ¹	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	128x10 ⁵	104x10 ⁴	91.875
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	912x10 ⁷	188x10 ⁷	79.386

Fecha de análisis: 21- ENE-13

Material o superficie de prueba: Piso.

Lote: 2

Tabla 17. Evaluación del sanitizante Process LpH st ®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	580x10 ⁷	172x10 ¹	99.999
<i>Escherichia coli</i>	536x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	448x10 ⁷	760x10 ¹	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	128x10 ⁵	120x10 ⁴	90.625
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	912x10 ⁷	184x10 ⁷	79.825

Fecha de análisis: 21- ENE-13

Material o superficie de prueba: Piso.

Lote: 3

Tabla 18. Evaluación del sanitizante Process LpH st ®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	580x10 ⁷	168x10 ¹	99.999
<i>Escherichia coli</i>	536x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	448x10 ⁷	732x10 ¹	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	128x10 ⁵	112x10 ⁴	91.250
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	912x10 ⁷	176x10 ⁷	80.702

En las siguientes Tablas se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la efectividad antimicrobiana del sanitizante **Process LpH st®** en el material de prueba **Plástico**:

Fecha de análisis: 29- ENE-13

Material o superficie de prueba: Plástico.

Lote: 1

Tabla 19. Evaluación del sanitizante Process LpH st ®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	464x10 ⁷	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	484x10 ⁷	280x10 ²	99.999
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	536x10 ⁷	236x10 ²	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	248x10 ⁵	128x10 ⁴	94.839
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	884x10 ⁷	268x10 ⁷	69.683



Fecha de análisis: 29- ENE-13

Material o superficie de prueba: Plástico.

Lote: 2

Tabla 20. Evaluación del sanitizante Process LpH st ®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	464x10 ⁷	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	484x10 ⁷	268x10 ²	99.999
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	536x10 ⁷	240x10 ²	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	248x10 ⁵	136x10 ⁴	94.516
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	884x10 ⁷	268x10 ⁷	69.683

Fecha de análisis: 29- ENE-13

Material o superficie de prueba: Plástico.

Lote: 3

Tabla 21. Evaluación del sanitizante Process LpH st ®.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	464x10 ⁷	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	484x10 ⁷	280x10 ²	99.999
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	536x10 ⁷	236x10 ²	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	248x10 ⁵	132x10 ⁴	94.677
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	884x10 ⁷	276x10 ⁷	68.778



En las siguientes Tablas se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la efectividad antimicrobiana del sanitizante **Alcohol Isopropílico 70%** en el material de prueba **Acero inoxidable**:

Fecha de análisis: 04- ENE-13

Material o superficie de prueba: Acero Inoxidable.

Lote: 1

Tabla 22. Evaluación del sanitizante Alcohol isopropílico 70% .

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	329x10 ⁷	284x10 ²	99.999
<i>Escherichia coli</i>	548x10 ⁵	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	164x10 ⁷	656x10 ¹	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	100x10 ⁵	68x10 ⁴	93.200
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	656x10 ⁷	992x10 ⁶	84.878



Fecha de análisis: 04- ENE-13

Material o superficie de prueba: Acero Inoxidable.

Lote: 2

Tabla 23. Evaluación del sanitizante Alcohol isopropílico 70% .

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	329x10 ⁷	276x10 ²	99.999
<i>Escherichia coli</i>	548x10 ⁵	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	164x10 ⁷	672x10 ¹	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	100x10 ⁵	68x10 ⁴	93.200
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	656x10 ⁷	104x10 ⁷	84.146

Fecha de análisis: 04- ENE-13

Material o superficie de prueba: Acero Inoxidable.

Lote: 3

Tabla 24. Evaluación del sanitizante Alcohol Isopropílico 70 %.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	329x10 ⁷	296x10 ²	99.999
<i>Escherichia coli</i>	548x10 ⁵	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	164x10 ⁷	672x10 ¹	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	100x10 ⁵	64x10 ⁴	93.600
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	656x10 ⁷	996x10 ⁶	84.817

En las siguientes Tablas se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la efectividad antimicrobiana del sanitizante **Alcohol isopropílico 70%** en el material de prueba **Piso**:

Fecha de análisis: 11- ENE-13

Material o superficie de prueba: Piso.

Lote: 1

Tabla 25. Evaluación del sanitizante Alcohol Isopropílico 70 %.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	964x10 ⁷	144x10 ¹	99.999
<i>Escherichia coli</i>	132x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	448x10 ⁵	12x10 ¹	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	100x10 ⁵	248x10 ³	97.520
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	664x10 ⁷	108x10 ⁷	83.735

Fecha de análisis: 11- ENE-13

Material o superficie de prueba: Piso.

Lote: 2

Tabla 26. Evaluación del sanitizante Alcohol Isopropílico 70 %.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	964x10 ⁷	140x10 ¹	99.999
<i>Escherichia coli</i>	132x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	448x10 ⁵	8x10 ¹	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	100x10 ⁵	268x10 ³	97.320
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	664x10 ⁷	116x10 ⁷	82.530

Fecha de análisis: 11- ENE-13

Material o superficie de prueba: Piso.

Lote: 3

Tabla 27. Evaluación del sanitizante Alcohol Isopropílico 70 %.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	964x10 ⁷	152x10 ¹	99.999
<i>Escherichia coli</i>	132x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	448x10 ⁵	16x10 ¹	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	100x10 ⁵	256x10 ⁴	97.440
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	664x10 ⁷	112x10 ⁷	83.133

En las siguientes Tablas se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la efectividad antimicrobiana del sanitizante **Alcohol isopropílico 70%** en el material de prueba **Plástico**:

Fecha de análisis: 31- ENE-13

Material o superficie de prueba: Plástico.

Lote: 1

Tabla 28. Evaluación del sanitizante Alcohol Isopropílico 70 % .

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	464x10 ⁷	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	312x10 ⁷	328x10 ²	99.999
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	364x10 ⁷	108x10 ¹	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	84x10 ⁵	4x10 ¹	99.999
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	884x10 ⁷	312x10 ⁷	64.706



Fecha de análisis: 31- ENE-13

Material o superficie de prueba: Plástico.

Lote: 2

Tabla 29. Evaluación del sanitizante Alcohol Isopropílico 70 %.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	464x10 ⁷	0	100.000
<i>Escherchia coli</i>	312x10 ⁷	336x10 ²	99.999
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	364x10 ⁷	116x10 ¹	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	84x10 ⁵	4x10 ¹	99.999
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	884x10 ⁷	312x10 ⁷	64.706

Fecha de análisis: 31- ENE-13

Material o superficie de prueba: Plástico.

Lote: 3

Tabla 30. Evaluación del sanitizante Alcohol Isopropílico 70 %.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	464x10 ⁷	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	312x10 ⁷	348x10 ²	99.999
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	364x10 ⁷	104x10 ¹	99.999
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	84x10 ⁵	4x10 ¹	99.999
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	884x10 ⁷	308x10 ⁷	65.158



En las siguientes Tablas se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la efectividad antimicrobiana del sanitizante **Cloro 4%** en el material de prueba **Acero inoxidable**:

Fecha de análisis: 09- ENE-13

Material o superficie de prueba: Acero Inoxidable.

Lote: 1

Tabla 31. Evaluación del sanitizante Cloro 4%.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	520×10^7	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	108×10^6	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	468×10^6	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	60×10^5	0	100.000
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	404×10^7	680×10^4	99.832



Fecha de análisis: 09- ENE-13

Material o superficie de prueba: Acero Inoxidable.

Lote: 2

Tabla 32. Evaluación del sanitizante Cloro 4% .

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	520x10 ⁷	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	108x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	468x10 ⁶	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	60x10 ⁵	0	100.000
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	404x10 ⁷	664x10 ⁴	99.836

Fecha de análisis: 09- ENE-13

Material o superficie de prueba: Acero Inoxidable.

Lote: 3

Tabla 33. Evaluación del sanitizante Cloro 4%.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	520x10 ⁷	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	108x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	468x10 ⁶	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	60x10 ⁵	0	100.000
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	404x10 ⁷	664x10 ⁴	99.836

En las siguientes Tablas se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la efectividad antimicrobiana del sanitizante **Cloro 4%** en el material de prueba **Piso**:

Fecha de análisis: 22- ENE-13

Material o superficie de prueba: Piso.

Lote: 1

Tabla 34. Evaluación del sanitizante Cloro 4%.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	276x10 ⁷	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	376x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	312x10 ⁷	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	60x10 ⁵	0	100.000
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	964x10 ⁷	936x10 ²	99.999



Fecha de análisis: 22- ENE-13

Material o superficie de prueba: Piso.

Lote: 2

Tabla 35. Evaluación del sanitizante Cloro 4%.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	276x10 ⁷	0	100.000
<i>Escheria coli</i>	376x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	312x10 ⁷	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	60x10 ⁵	0	100.000
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	964x10 ⁷	796x10 ²	99.999

Fecha de análisis: 22- ENE-13

Material o superficie de prueba: Piso.

Lote: 3

Tabla 36. Evaluación del sanitizante Cloro 4%.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	276x10 ⁷	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	376x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	312x10 ⁷	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	60x10 ⁵	0	100.000
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	964x10 ⁷	804x10 ²	99.999



En las siguientes Tablas se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la efectividad antimicrobiana del sanitizante **Cloro 4%** en el material de prueba **Plástico**:

Fecha de análisis: 22- ENE-13

Material o superficie de prueba: Plástico.

Lote: 1

Tabla 37. Evaluación del sanitizante Cloro 4%.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	396x10 ⁷	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	672x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	228x10 ⁶	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	140x10 ⁴	0	100.000
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	924x10 ⁷	472x10 ¹	99.999



Fecha de análisis: 22- ENE-13

Material o superficie de prueba: Plástico.

Lote: 2

Tabla 38. Evaluación del sanitizante Cloro 4%.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	396x10 ⁷	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	672x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	228x10 ⁶	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	140x10 ⁴	0	100.000
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	924x10 ⁷	460x10 ¹	99.999

Fecha de análisis: 22- ENE-13

Material o superficie de prueba: Plástico.

Lote: 3

Tabla 39. Evaluación del sanitizante Cloro 4%.

Microorganismo de prueba	Cuenta Viable inicial en el material de prueba (C.V.) UFC	Células Sobrevivientes en el material de prueba (S) UFC	% Reducción
<i>Staphylococcus aureus</i>	396x10 ⁷	0	100.000
<i>Escherichia coli</i>	672x10 ⁶	0	100.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	228x10 ⁶	0	100.000
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	140x10 ⁴	0	100.000
<i>Bacillus subtilis subespecie spizizenii</i>	924x10 ⁷	476x10 ¹	99.999



Tabla 40. Resumen del % de Reducción de los Sanitizantes.

	Sanitizante	Process Vesphene Ilt®			\bar{X}	Process LpH st®			\bar{X}
		Lote	1	2		3	1	2	
		% Reducción				%Reducción			
Acero inoxidable	<i>S.aureus</i>	100.000	100.000	100.000	100.000	99.999	99.999	99.999	99.999
	<i>E.coli</i>	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>S.epidermidis</i>	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>A.brasiliensis</i>	76.667	76.111	75.556	76.111	82.500	84.167	82.500	83.056
	<i>B.spizizenii</i>	44.706	48.235	44.706	45.882	78.916	78.313	78.313	78.514
Piso epóxico	<i>S.aureus</i>	100.000	100.000	100.000	100.000	99.999	99.999	99.999	99.999
	<i>E.coli</i>	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>S.epidermidis</i>	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>A.brasiliensis</i>	83.182	81.364	82.273	82.273	91.875	90.625	91.250	91.250
	<i>B.spizizenii</i>	63.128	64.246	63.687	63.687	79.386	79.825	80.702	79.971
Plástico cristal	<i>S.aureus</i>	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>E.coli</i>	99.999	99.999	99.999	99.999	99.999	99.999	99.999	99.999
	<i>S.epidermidis</i>	99.999	99.999	99.999	99.999	99.999	99.999	99.999	99.999
	<i>A.brasiliensis</i>	95.862	95.590	95.172	95.541	94.839	94.516	94.677	94.677
	<i>B.spizizenii</i>	67.826	67.826	66.523	67.392	69.683	69.683	68.778	69.381

Tabla 41. Resumen del % de Reducción de los Sanitizantes.

	Sanitizante	Alcohol isopropílico 70%			\bar{X}	Cloro 4%			\bar{X}
		Lote	1	2		3	1	2	
		% Reducción				%Reducción			
Acero inoxidable	<i>S.aureus</i>	99.999	99.999	99.999	99.999	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>E.coli</i>	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>S.epidermidis</i>	99.999	99.999	99.999	99.999	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>A.brasiliensis</i>	93.200	93.200	93.600	93.333	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>B.spizizenii</i>	84.878	84.146	84.817	84.614	99.832	99.836	99.836	99.835
Piso epóxico	<i>S.aureus</i>	99.999	99.999	99.999	99.999	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>E.coli</i>	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>S.epidermidis</i>	99.999	99.999	99.999	99.999	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>A.brasiliensis</i>	97.520	97.320	97.440	97.427	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>B.spizizenii</i>	83.735	82.530	83.133	83.133	99.999	99.999	99.999	99.999
Plástico cristal	<i>S.aureus</i>	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>E.coli</i>	99.999	99.999	99.999	99.999	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>S.epidermidis</i>	99.999	99.999	99.999	99.999	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>A.brasiliensis</i>	99.999	99.999	99.999	99.999	100.000	100.000	100.000	100.000
	<i>B.spizizenii</i>	64.706	64.706	65.158	67.392	100.000	100.000	100.000	100.000

9. Discusión.

- Se realizó la evaluación de la efectividad del sanitizante in situ de los tres lotes de Process Vesphene I1st®, se obtuvo del 99.999 al 100 % de reducción de la biocarga expuesta con cada microorganismo de prueba no esporulado (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*) en un tiempo de contacto de una hora del sanitizante con cada uno de los diferentes materiales de prueba: acero inoxidable, piso epóxico, plástico cristal (ver tabla 40).

Para los microorganismos de prueba esporulados (*Aspergillus niger* y *Bacillus spizizenii*, se obtuvieron los siguientes resultados, para el hongo *Aspergillus niger* se logró para el material de prueba acero inoxidable una reducción de la biocarga del 75.556 % al 76.667%, para el piso epóxico se obtuvo una reducción de 81.364 % al 83.162 %, para el plástico cristal se presentó una reducción de 95.172% al 95.862 %. Para *Bacillus spizizenii* se obtuvo para el material de prueba acero inoxidable una reducción de la biocarga del 44.706 % al 48.235%, para el piso epóxico se obtuvo una reducción de 63.128 % al 64.246 %, para el plástico cristal se presentó una reducción de 66.523% al 67.826%.

El sanitizante Process Vesphene I1st® tiene como principal activo el o-fenilfenol que es un derivado fenólico alcalino, que de acuerdo a su composición química ejerce su actividad alterando la permeabilidad de la membrana plasmática, provocando la pérdida de los componentes intracelulares, incluyendo la liberación de K^+ (Negromi,2009), también desnaturaliza las proteínas de los microorganismos e inactiva las oxigenasas y deshidrogenasas (Fraise,1999), por ello resulto efectivo contra las bacterias no esporuladas y en el caso del hongo *A. niger* se observó que tiene menor acción o capacidad de eliminar a este microorganismo en comparación con las bacterias no esporuladas, debido a que solo se logró disminuir la biocarga en los diferentes materiales de prueba, pero no se logró eliminar el 99.999% de la biocarga, ya que su acción antifúngica solo involucra el daño de la



membrana plasmática, dando lugar a fugas de los componentes intracelulares (McDonnell,1999). De igual manera para el microorganismo esporulado *B.subtilis* se observó que no se eliminó el 99.999% en las diferentes superficies de prueba, debido a que el o-fenilfenol, que es el principio activo que contiene este sanitizante actuó sobre las bacterias vegetativas y no presento una acción eficaz sobre las esporas de este tipo de microorganismo, porque no tiene efecto esporicida (Font, 2001), pero se logró reducir la carga microbiana para las diferentes superficies de prueba, esto se debe a que la conversión de las bacterias vegetativas en esporas está acompañada por cambios en la estructura, metabolismo y composición química.

Por ello las esporas bacterianas presentan una mayor resistencia a la inactivación por diversas agresiones físicas y químicas, forman una barrera a la entrada de los sanitizantes por medio de sus capas de envolturas y cortex , las membranas que rodean el núcleo de la espora también actúan como factor adicional que limita la penetración del sanitizante (Rusell, 1997) evitando la acción de este.

- Se realizó la evaluación de la efectividad del sanitizante in situ de los tres lotes de Process LpH st ®, se obtuvo del 99.999 % al 100% de reducción de la biocarga expuesta con cada microorganismo de prueba no esporulado (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*) en un tiempo de contacto de una hora del sanitizante con cada uno de los diferentes materiales de prueba: acero inoxidable, piso epóxico, plástico cristal (ver tabla 40).

Para los microorganismos de prueba esporulados (*Aspergillus niger* y *Bacillus spizizenii*), se obtuvieron los siguientes resultados, para el hongo *Aspergillus niger* se logró para el material de prueba acero inoxidable una reducción de la biocarga del 82.500 % al 84.167 %, para el piso epóxico se obtuvo una reducción de 90.625% al 91.875 % , para el plástico cristal se presentó una reducción de 94.516 % al 94.839%. Para *Bacillus spizizenii* se obtuvo para el material de prueba acero



inoxidable una reducción de la biocarga del 78.313 % al 78.916%, para el piso epóxico se obtuvo una reducción de 79.386 % al 80.702 %, para el plástico cristal se presentó una reducción de 68.778% al 69.683%

El sanitizante Process LpH st®, tiene como principal activo el o-fenilfenol que es un derivado fenólico no alcalino, que de acuerdo a su composición química ejerce su actividad de la misma forma que el sanitizante Process Vesphene Ilst® (en el mecanismo antes mencionado). De acuerdo con el proveedor la formulación del sanitizante Process LpH st®, resulta ideal para ser utilizada en un programa de rotación de sanitizantes con la formulación alcalina de Process Vesphene Ilst®. Asimismo, estos productos contienen surfactantes que mejoran la eficacia de la sanitización y contribuyen al rendimiento de la limpieza.

- Se realizó la evaluación de la efectividad del sanitizante in situ de los tres lotes de Alcohol isopropílico 70% se obtuvo del 99.999 % al 100% de reducción de la biocarga expuesta con cada microorganismo de prueba no esporulado (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*) en un tiempo de contacto de una hora del sanitizante con cada uno de los diferentes materiales de prueba: acero inoxidable, piso epóxico, plástico cristal (ver tabla 41).

Para los microorganismos de prueba esporulados (*Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis subespecie spizizenii*), se obtuvieron los siguientes resultados, para el hongo *Aspergillus niger* se logró para el material de prueba acero inoxidable una reducción de la biocarga del 93.200 % al 93.600 %, para el piso epóxico se obtuvo una reducción de 97.320% al 97.520 %, para el plástico cristal se presentó una reducción de 99.999%. Para *Bacillus spizizenii* se obtuvo para el material de prueba acero inoxidable una reducción de la biocarga del 84.146 % al 84.878%, para el piso epóxico se obtuvo una reducción de 82.530% al 83.735%, para el plástico cristal se presentó una reducción de 64.706% al 65.158%.



El Alcohol isopropílico 70% es utilizado a esta concentración como sanitizante ya que es la concentración optima recomendada, las concentraciones por debajo del 50 % son utilizadas como conservantes y para potenciar la actividad de otros biocidas, mientras que las concentraciones mayores a 90% deshidratan a los microorganismos y los conservan en lugar de destruidos. (Tortora, 2007)

Este sanitizante tiene mayores propiedades lipofílicas que el alcohol etílico y aumenta su eficacia en base a la presencia de agua, ya que al ser un compuesto acuoso penetra mejor en las células destruyendo la membrana celular, desnaturaliza las proteínas por inhibición de la producción de metabolitos esenciales y solubiliza lípidos, provocando interferencia con el metabolismo y lisis celular (Negromi, 2009). Este sanitizante actuó frente a las bacterias no esporuladas ejerciendo su actividad antimicrobiana, mientras que para *A. niger* se observó que tiene menor acción o capacidad de eliminar a este microorganismo en comparación con las bacterias no esporuladas, debido a que solo se logró disminuir la biocarga en dos de los diferentes materiales de prueba en un porcentaje del 93.200 al 97.520% y se logró eliminar el 99.999% de la biocarga para la superficie de prueba plástico cristal, aunque el sanitizante no tiene efecto persistente porque se evapora con facilidad sus efectos biológicos de daño microbiano permanecen por varias horas (McDonnell, 1999).

Para el microorganismo esporulado *B.subtilis* se observó que no se eliminó el 99.999% en las diferentes superficies de prueba, debido a que este sanitizante no tiene actividad esporicida, sin embargo, se sabe que inhibe la esporulación y la germinación de las esporas, pero este efecto es reversible, por lo que solo contribuyó a la reducción de la biocarga de las diferentes superficies (McDonnell, 1999).

- Se realizó la evaluación de la efectividad del sanitizante in situ de los tres lotes de Cloro 4% se obtuvo el 99.999 % de reducción de la

biocarga expuesta con cada microorganismo de prueba no esporulado (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*) en un tiempo de contacto de una hora del sanitizante con cada uno de los diferentes materiales de prueba: acero inoxidable, piso epóxico, plástico cristal (ver tabla 41).

Para los microorganismos de prueba esporulados (*Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis subespecie spizizenii*), se obtuvieron los siguientes resultados, para el hongo *Aspergillus niger* se logró una reducción de la biocarga del 99.999% para los materiales acero inoxidable, piso con recubrimiento epóxico y plástico. Para *Bacillus spizizenii* se obtuvo para el material de prueba acero inoxidable una reducción de la biocarga del 99.832 % al 99.836%, para el piso epóxico y el plástico cristal se obtuvo una reducción de 99.999 %.

El sanitizante Cloro 4% que se utilizó proviene de la forma líquida hipoclorito de sodio (NaOCl), la acción que ejerce está determinada por el ácido hipocloroso (HOCl) que se forma cuando el cloro se agrega al agua.

Este sanitizante es un agente oxidante fuerte que inactiva las reacciones enzimáticas y de ácidos nucleicos, desnaturaliza las proteínas de las células bacterianas e interrumpe la fosforilización oxidativa. La potenciación de la oxidación se puede producir a bajo pH, en donde la actividad es máxima y se logra la mayor penetración de las capas externas de las células, implica la formación de derivados clorados de bases de nucleótidos en el ADN bacteriano.

Este sanitizante actuó frente a las bacterias no esporuladas y *A. niger* ejerciendo su actividad por el ácido hipocloroso (HOCl) no disociado, que es la forma más eficaz del cloro porque es neutro respecto de su carga eléctrica y se difunde con igual rapidez que el agua a través de la pared celular, logrando una reducción de la biocarga del 99.999% en los tres diferentes materiales de prueba acero inoxidable, piso epóxico y el



plástico cristal. Mientras que el ion hipoclorito (OCl^-) tiene un efecto mínimo en comparación con el ácido hipocloroso (HOCl), debido a su carga negativa, el ion hipoclorito (OCl^-) no puede entrar libremente a la célula. Esta disociación depende del pH, a medida que este aumenta la actividad microbicida disminuye.

El Cloro 4% actuó frente a los microorganismos esporulados *Bacillus spizizenii*, ocasionando un aumento de la permeabilidad de la capa de la espora, lo que produce que se separe de la corteza y se produzca la lisis (Negromi,2009), logrando una reducción de la biocarga del 99.999% en solo dos de los materiales de prueba piso epóxico y el plástico cristal, para el material de prueba acero inoxidable solo se logró una reducción de la biocarga del 99.832 % al 99.836% , muy cercana a la esperada.

- En la evaluación in situ se observó que al retar cada uno de los sanitizantes con cada uno de los microorganismos de prueba, se pudo eliminar con mayor facilidad a los microorganismos no esporulados (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*) que a los microorganismos esporulados (*Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis subespecie spizizenii*), esto se atribuye a que la actividad antimicrobiana de los sanitizantes probados dependen del espectro de acción y de la composición de las células microbianas sobre las que actúan, debido a que los microorganismos varían en su respuesta frente a los sanitizantes, mediante una propiedad natural que presenta cada microorganismo que le permite eludir su acción por sus diferencias en las estructuras celulares.
- A continuación se menciona en orden decreciente la facilidad con la que se eliminaron los microorganismos con respecto a los sanitizantes evaluados: bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), bacteria gramnegativa (*Escherichia coli*), seguida del hongo *Aspergillus niger*, por último el microorganismo esporulado *Bacillus subtilis subespecie spizizenii* que fue el que logro eludir la acción de la mayoría de los sanitizantes, gracias a que su



estructura es mucho más compleja que los demás, debido a que posee múltiples capas que impide la permeabilidad y evita la acción del sanitizante (McDonnell, 1999).

- Se observó en base a los resultados de la evaluación in situ que el mejor sanitizante es el Cloro 4% , tanto para los microorganismos no esporulados como para los esporulados al presentar un mayor espectro de acción en comparación con los otros sanitizantes. Aunque no es recomendable el uso diario de este sanitizante ya que es tóxico y corrosivo ocasionando daño a los materiales.

Seguido del Cloro se encuentra el sanitizante Process Vespene Ilist® que resulto el segundo mejor sanitizante, al haber presentado un mayor espectro de acción solo sobre los microorganismos no esporulados en la mayoría de las superficies de prueba, siendo este menos tóxico y sin causar daño a los materiales , aunque cabe mencionar que el sanitizante Process LpH st ® es muy similar en su espectro de acción solo que este es un agente fenólico en medio ácido, por lo que quizás lo recomendable sea solo utilizar uno de los dos sanitizantes para su uso en las áreas de fabricación.

- Por otra parte, la cantidad que se inoculó en los materiales o superficies de prueba fue del orden de 10^8 UFC/ mL para las bacterias y de 10^6 UFC/ mL para el hongo, representan un escenario “el peor de los casos”, esta cantidad de biocarga muy rara vez se encuentra en las áreas de fabricación, además el tiempo de exposición es un factor muy importante y necesario para que el sanitizante produzca la muerte de los microorganismos, ya que es directamente proporcional al logaritmo de la concentración bacteriana inicial, es decir, que se requiere mayor tiempo para destruir concentraciones elevadas de microorganismos que para destruir las concentraciones bajas (Martínez, 2006). Por lo que se demostró que en un tiempo de una hora de contacto con los sanitizantes evaluados se redujo la biocarga, mientras que en otros casos se logró eliminar el 99.999% de los microorganismos y con ello se lograra



eliminar o reducir la biocarga encontrada en las áreas de fabricación a niveles aceptables, obteniéndose seguridad y eficacia con los sanitizantes evaluados.

- De los materiales o superficies de prueba evaluados no se podría mencionar que superficie es la más difícil de sanitizar, ya que esta dificultad depende de la irregularidad de la superficie. Aunque en la industria la mayoría de las superficies son de acero inoxidable por la facilidad que brinda para su limpieza y su resistencia a agentes químicos (sanitización), se ha detectado que los mecanismos de limpieza mecánica pueden ocasionar pequeñas fisuras o grietas en la superficie que podrían funcionar como sitios de colonización para los microorganismos y depósitos de materiales orgánicos remanentes (Wiertanen, 1996), de igual forma le puede ocurrir esto a los materiales evaluados.
- Es necesario recordar que la concentración de un sanitizante influye en su actividad, de modo que se debe diluir exactamente según las indicaciones del fabricante para su preparación, ya que la relación entre el agua y el ingrediente activo puede ser esencial y si no se agrega suficiente agua es factible que no se libere la cantidad de agente químico necesario para la sanitización de la superficie, de esta forma se pierde efectividad y se verá afectada en la eliminación de la biocarga (Forbes, 2009).

10. Conclusiones .

- Se evaluó la efectividad antimicrobiana de los sanitizantes Process Vesphene I1st®, Process LpH st®, Alcohol Isopropílico 70%, Cloro 4 % utilizados en las áreas de fabricación a través de un método in situ.



- Se realizó la evaluación de cada uno de los sanitizantes empleados a la concentración de uso recomendada y con el tiempo de exposición utilizado en las áreas de fabricación se verificó su eficacia.
- Los sanitizantes evaluados Process Vesphene I1st®, Process LpH st®, Alcohol Isopropílico 70%, Cloro 4 %, cumplieron con el criterio de aceptación para los microorganismos no esporulados, al presentar un efecto bactericida en un 99.999% de la biocarga.
- El uso del sanitizante Process Vesphene I1st® aportó una disminución de la biocarga inicial inhibiendo el crecimiento de las esporas de *A. niger* de un 44% a un 68% y de de *Bacillus spizizenii* de un 75% a un 96%, sobre las superficies probadas, pero no presentó una actividad fungicida ni esporicida en el periodo de tiempo establecido.
- El uso del sanitizante Process LpH st® aportó una disminución de la biocarga inicial inhibiendo el crecimiento de las esporas de *A. niger* de un 82% a un 95% y de de *Bacillus spizizenii* de un 68% a un 81%, sobre las superficies probadas, pero no presentó una actividad fungicida ni esporicida en el periodo de tiempo establecido.
- El uso del sanitizante Alcohol Isopropílico 70% logró presentar actividad fungicida solo sobre el plástico cristal, mientras que para los demás materiales de prueba solo aportó una disminución de la biocarga inicial inhibiendo el crecimiento de las esporas de *A. niger* de un 93% a un 97% y de *Bacillus spizizenii* de un 64% a un 85%, sobre las superficies probadas, pero no presentó una actividad esporicida en el periodo de tiempo establecido.



- El uso del sanitizante Cloro 4% logró presentar actividad fungicida sobre las esporas de *Aspergillus niger* al reducir la biocarga en un 99.999% en los materiales de prueba, mientras que las esporas de *Bacillus subtilis subespecie spizizenii* presento actividad esporicida sobre el plástico cristal y piso epóxico al reducir la biocarga en un 99.999% mientras que para el acero inoxidable solo apporto una disminución de la biocarga inicial inhibiendo el crecimiento de las esporas hasta un 99.832%.
- El mejor sanitizante es el Cloro 4%, tanto para los microorganismos no esporulados como para los esporulados al presentar un mayor espectro de acción en comparación con los otros sanitizantes sobre la mayoría de las superficies evaluadas.
- El sanitizante Process Vespene I1st® resulto el segundo mejor sanitizante, al haber presentado un mayor espectro de acción pero solo sobre los microorganismos no esporulados en la mayoría de las superficies evaluadas.
- De los materiales o superficies de prueba evaluados no se podría mencionar que superficie es la más difícil de sanitizar, ya que esta dificultad depende de la irregularidad de la superficie.
- Se demostró que con el modelo del “peor de los casos” los sanitizantes evaluados redujeron la biocarga y los resultados obtenidos podrán ser aplicados para una optimización de los procesos de sanitización de las áreas de fabricación de ALCON México para obtener seguridad y eficacia.



11. Bibliografía

- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. Official. Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical, Chemists, Washington,USA, Vol. I, 2000. pp 2-9,
- Farmacopea de los Estados Unidos USP 35, 2012. <1072> Desinfectantes y Antisépticos. pp.676- 678
- Font, Elisabet. *Antisépticos y desinfectantes*. Consultada en mayo 2013. <http://www.doymafarma.com>
- Forbes,Betty. *Bailey&Scott´s .Diagnostico Microbiológico*. 12 ed. Médica Panamericana. Argentina. 2009. pp. 46-47.
- Korolkovas,A. *Compendio esencial de Química Farmacéutica*. Reverté. España.1986. pp. 561-570.
- Maillard, Jean-Yves. *Antimicrobial biocides in the healthcare environment: efficacy, usage, policies, and perceived problems*. Therapeutics and Clinical Risk Management 2005:1(4). Dove Medical Press Limited. pp 307– 320.
- Mandigan,M. *Brock: Biología de los Microorganismos*. 10ª ed. Pearson Prentice Hall.España. 2003.pp 164,696-699.
- *Manipulación de productos químicos y de limpieza*.Vértice.España.2011. pp 56-65.
- Martinez, José E. *What is Disinfectant Validation?*. Pharmaceutical Technology. 2006. consultada en abril 2013 <http://www.pharmtech.com/pharmtech/article/articleDetail.jsp?id=311252>
- McDonnell, Gerald and a. Denver Russel. *Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance*. Clinical Microbiology Rewies 12 (1999) pp 147-179.
- Montoya, H. *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. 2ª ed. Antioquia. Colombia.2008. pp 221-225.
- Negromi, Marta. *Microbiología Estomatológica: Fundamentos y Guía Práctica*.2ª ed. Médica Panamericana. Argentina, 2009. pp. 107-119.
- NMX-BB-040-SCFI-1999 “Métodos Generales de Análisis-Determinación de la Actividad Antimicrobiana en Productos Germicidas”.
- NOM-059-SSA1-2013 “Buenas prácticas de fabricación de medicamentos”.



- Reybrouck, Gerald .*The testing of disinfectants*, International Biodeterioration & Biodegradation 41 (1998) pp. 269-272.
- Russell, Furr Jr. *Microbial susceptibility and resistance to biocides*. ASM News 1997; 63 (9) pp 481-487.
- Tortora, Gerard J. *introducción a la Microbiología*. 9ª ed. Médica Panamericana. Argentina. 2007. pp. 198-205
- Wirtanen, G. et al. 1996. *Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with Bacillus biofilms after rising and cleaning procedures in closed food-processing systems*. Journal of Protection 59. pp 727-733.

12. Anexo 1.

Preparación de Soluciones, Medios de Cultivo y Sanitizantes.

Preparación de Soluciones.

a) Solución Salina estéril al 0.85%.

Cloruro de sodio.....8,5 g

Agua purificada.....1000 mL

Se colocaron 8,5 g de cristales de cloruro de sodio en un matraz Erlenmeyer y se disolvieron en 1000 mL de agua purificada, de la solución anterior, se tomaron porciones de 9 mL y se depositaron en tubos de ensaye 16x150 mm con tapa de rosca para su posterior esterilización en autoclave.

b) Solución Stock amortiguadora de fosfatos 0.25 M.

Disolver 34 g de fosfato de Potasio Monobásico (KH_2PO_4) en 500 mL de agua purificada, ajustar el pH entre 7.1 y 7.3 con de Hidróxido de Sodio 1N, aforar con agua purificada hasta obtener 1000 mL. Esterilizar en autoclave y conservar en refrigeración.



c) Solución Neutralizante concentrada.

Mezclar 40 g de Lecitina de soya (azolecitina) con 280 mL de polisorbato 80 y 1.25 mL de la solución Stock amortiguadora de fosfatos 0.25 M, 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, distribuir en porciones de 100 mL. Esterilizar.

d) Solución neutralizante diluida.

Mezclar 100 mL de la solución neutralizante concentrada con 25 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M, adicionar 1675 mL de agua, mezclar y distribuir en porciones de 9 mL en tubos con rosca de 20 mm x 150 mm. Esterilizar.

e) Solución de tiosulfato de sodio estéril al 15%.

Tiosulfato de sodio.....150 g
Agua purificada.....1000 mL

Se colocaron 150 g de cristales de cloruro de sodio en un matraz Erlenmeyer y se disolvieron en 1000 mL de agua purificada, de la solución anterior, se tomaron porciones de 4 mL y se depositaron en tubos de ensaye 16x150 mm con tapa de rosca para su posterior esterilización en autoclave.

Preparación de Medios de Cultivo.

a) Agar Nutritivo

Fórmula: Gramos por litro de agua purificada (g/ L).

Agar- agar.....15,0
Extracto de carne de res.....3,0
Peptona de gelatina.....5,0
pH: 6.8 ± 0.2

Rehidratar 23g del medio en un litro de agua purificada. Calentar hasta punto de ebullición para disolver el medio por completo. Distribuir en porciones de 250 mL en botellas de Roux y de 10 mL en tubos de ensaye con tapón de rosca (inclinados) y esterilizar a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

b) Agar para Métodos Cuenta Estándar.

Fórmula aproximada para 1000 mL de agua purificada:

Peptona de Caseína5,0 g

Dextrosa.....1,0 g

Extracto de Levadura.....2,5 g

Agar.....15,0 g

pH: 7.0 ± 0.2

Rehidratar 23.5 g del polvo en un litro de agua purificada. Mezclar preferentemente, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta su dilución completa. Distribuir porciones de 500 mL en matraces Erlenmeyer de 1 L y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

c) Agar Dextrosa Sabouraud.

Formula: Gramos por litro de agua purificada. (g/ L)

Agar.....15,0

Dextrosa.....40,0

Peptona.....10,0

pH: 5.6 ± 0.2

Rehidratar 65 g del medio en un litro de agua purificada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar por autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. No sobreesterilizar para evitar caramelización de la Dextrosa. Enfriar aproximadamente a 45°C. Verter en cajas petri estériles.



d) Agar Soya Trypticaseína.

Composición típica (g/ L)

Peptona de caseína.....15,0

Peptona de harina de soja5,0

Cloruro sódico.....5,0

Agra-agar.....15,0

pH: 7.3± 0.2 a 25°C

Disolver 40 g en 1 Litro de agua purificada calentando en un baño de agua hirviendo o en corriente de vapor; esterilizar en autoclave (15 min a 121°C).

Preparación de los Sanitizantes Evaluados.

a) Process Vesphene Iist. STERIS®

Diluir 59.1 mL de Process Vesphene Iist. STERIS® en 7.5 litros de agua purificada.

b) Process LpH st. STERIS®

Diluir 29.6 mL de Process LpH st. STERIS® en 7.5 litros de agua purificada.

c) Alcohol Isopropílico 70%

Descripción de los cálculos para la preparación del sanitizante

Aplicar la siguiente fórmula:

$(70 \times V / 100) =$ volumen de alcohol a diluir al volumen deseado.

70 = concentración deseada.

V = volumen a preparar.



d) Cloro 4 %.

Descripción de los cálculos para la preparación del sanitizante.

Valoración del Cloro (ver resultado en el certificado del proveedor)= A (g/L)

Aplicar la siguiente fórmula para obtener los g/100 ml de cloro en la solución de hipoclorito de sodio.

B= g de cloro en 100 ml de hipoclorito de sodio.

$$(Ax100/1000)= B$$

Aplicar la siguiente fórmula para obtener la solución al % requerido.

$$(Cx100/B)= D$$

C = % requerido

D = ml de cloro que están en 100 ml de hipoclorito de sodio.

Para calcular la cantidad total a preparar aplicar la siguiente fórmula:

V = volumen total de solución de cloro al % requerido.

$$(DxV /100) = T$$

T = total de hipoclorito de sodio que se tiene que diluir al volumen total, para obtener la concentración deseada de cloro.

