



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
ALVARTIS PHARMA S.A. DE C.V.**

EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE SANITIZANTES PARA USO EN ÁREAS DE FABRICACIÓN Y MICROBIÓLOGIA EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

**TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA
IVETH LILIAN JIMÉNEZ GARCÍA**

**DIRECTOR DE TESIS
QFB. MARÍA REINA JURADO ANDRADE**

PUEBLA 2015

Dedicatorias

- + *A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorar cada día más la vida.*
- + *A mi abuelita Carmen que aunque ya no logró ver culminado este momento siempre está presente y es a quien debo y agradezco todo lo que soy.*
- + *A mi mamá por darme la vida, por su apoyo y los sacrificios que hizo por mí.*
- + *A mis tías Vero y Tacha a quienes quiero mucho, por hacer de mí una persona fuerte, responsable y con valores gracias a sus consejos y apoyo incondicional.*
- + *A mi pequeña hermana Aline, por ser mi mayor motor para superarme y ser un ejemplo a seguir.*
- + *A Ismael por ser mi compañero, por estar en los buenos y malos momentos, gracias a su apoyo, paciencia, comprensión y por siempre creer en mí.*

AGRADECIMIENTOS

A los integrantes de la Comisión revisora y miembros del Jurado

1 QFB. Cesar Tecozautla Varela	Fac. Cs. Químicas de la BUAP
2 QFB. Marco Antonio González Coronel	Fac. Cs. Químicas de la BUAP
3 LF. Juan Carlos Bonilla Sánchez	Fac. Cs. Químicas de la BUAP

Al Laboratorio Alvartis Pharma S. A. de C. V. por permitirme realizar éste trabajo.

A la QBP. Angélica Delgadillo Rodríguez por compartir su conocimiento y experiencia para la mejora de éste trabajo y de mi desarrollo profesional.

A la maestra Reina a quien debo la realización de éste trabajo, gracias por sus enseñanzas y su apoyo.

A los chicos y becarios del departamento de Microbiología Bety, Jaqui, Fany, Dulce y Ale, por su compañerismo y apoyo en el desarrollo de éste trabajo.

A Juan Carlos por ser mi guía en este trayecto, gracias por compartir tus conocimientos y experiencias.

ÍNDICE

Justificación	1
Objetivos	1
Hipótesis	1
Introducción	2
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	
1.1 Contaminación en la industria farmacéutica	3
1.1.1 Fuentes e incidencia de la contaminación	3
1.1.2 Prevención y control de la contaminación	6
1.2 Sanitización	7
1.2.1 Selección de sanitizantes	9
1.2.2 Alcohol Isopropílico	11
1.2.3 Hipoclorito de sodio	12
1.2.4 Desfan-100	13
1.2.5 Cloruro de benzalconio	15
1.3 Microorganismos	17
1.3.1 S.aureus	17
1.3.2 E.coli	20
1.3.3 P. aeruginosa	22
1.3.4 A.lwoffii	23
1.3.5 C. albicans	25
1.3.6 A. brasiliensis	26
CAPITULO II. PARTE EXPERIMENTAL	
2.1 Preparación de sanitizantes	28
2.2 Estandarización de suspensiones microbianas	29
2.3 Cuenta viable inicial	30
2.4 Desafío de sanitizantes	32
2.5 Determinación de UFC/mL sobrevivientes y porcentaje de reducción	33
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION	
3.1 Estandarización de suspensiones microbianas	34
3.2 Porcentaje de reducción	35
CAPITULO IV. CONCLUSIÓN	40
CAPITULO V. BIBLIOGRAFÍA	41

ÍNDICE DE TABLAS

Número	Título de la tabla	Pag.
1.1	Fuentes de contaminación microbiana.	5
1.1.1	Parámetros de control microbiológico en áreas clase ISO	6
1.2	Actividad de sanitizantes	16
1.3	Patología de S. aureus	19
1.3.1	Factores de virulencia de S. aureus	19
1.3.2	Factores de virulencia en E. coli asociados a gastroenteritis	21
1.3.3	Patología P. aeruginosa	23
1.3.4	Patología A. lwoffii	24
2.1	Preparación de soluciones sanitizantes	29
2.4	Etapas para desafío de sanitizantes	32
3.1	Estandarización de suspensiones bacterianas	34
3.2	Estandarización de suspensiones para mohos y levaduras	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Título de la figura	Pag.
1.1	Factores que intervienen en la fabricación Higiénica	4
1.2	Efecto estático frente al crecimiento microbiano	8
1.2.1	Efecto biocida sobre el crecimiento microbiano	8
1.2.2	Efecto lítico sobre el crecimiento microbiano	9
1.2.3	Estructura química 2-propanol	11
1.2.4	Estructura química de Hipoclorito de sodio	13
1.2.5	Compuestos activos de Desfan-100	14
1.2.6	Estructura química de Cloruro de benzalconio	15
1.3.1	E. coli. Morfología colonial y microscópica	20
1.3.2	P.aeruginosa. Morfología colonial y microscópica	22
1.3.3	A. lwoffii. Morfología colonial y microscópica	24
2	Diagrama general de trabajo.	27

2.3	Cuenta de bacterias en placa	30
2.4	Método general desafío de sanitizantes	31
2.5	Método general para cuenta de UFC/mL	32
3.1	Evaluación del porcentaje de reducción de <i>S. aureus</i>	35
3.2	Evaluación del porcentaje de reducción de <i>E. coli</i>	36
3.3	Evaluación del porcentaje de reducción de <i>P.aeruginosa</i>	36
3.4	Evaluación del porcentaje de reducción de <i>A. lwoffii</i>	37
3.5	Evaluación del porcentaje de reducción de <i>C.albicans</i>	38
3.6	Evaluación del porcentaje de reducción de <i>A.brasiliensis</i>	38

Justificación

El procedimiento de Limpieza y sanitización en la industria farmacéutica es uno de los puntos auditables para garantizar el cumplimiento de las normas nacionales e internacionales dirigidas a este tipo de industrias; por ello el Laboratorio Farmacéutico Alvartis Pharma S.A. de C.V. requiere implementar un ensayo que permita demostrar la eficacia de los sanitizantes en la concentración adecuada de uso empleados para la sanitización de áreas de producción y microbiología cuyo costo sea sencillo.

Objetivo General

Implementar un ensayo rápido, accesible y económico para demostrar la eficacia de Hipoclorito de sodio al 1%, Cloruro de benzalconio al 0.2%, Desfan-100 al 0.2% y Alcohol Isopropílico al 70 % empleados como soluciones sanitizantes de áreas de fabricación y microbiología.

Objetivos Específicos

- Evaluar la efectividad de las soluciones sanitizantes a la concentración de uso frente microorganismos gram positivos y gram negativos.
- Conocer la capacidad de las soluciones sanitizantes frente microorganismos formadores de biofilm.
- Evaluar la eficiencia de las soluciones sanitizantes frente hongos filamentosos y levaduras.
- Evaluar la estabilidad y efectividad sanitizante de las soluciones durante su periodo de vida útil.

Hipótesis

Las soluciones sanitizantes: Hipoclorito de sodio al 1%, Cloruro de benzalconio al 0.2%, Desfan-100 al 0.2% y Alcohol Isopropílico al 70% reducen en un 99.999% la cuenta de UFC/mL de los microorganismos de prueba demostrando su efectividad sanitizante sin ser afectada por el tiempo.

Introducción

La industria farmacéutica es un sector vital en el ciclo de la asistencia a la salud por lo que se busca garantizar la obtención de medicamentos de calidad.

Mediante las normas conocidas como las “Prácticas Adecuadas de Fabricación” (PAF) o “Buenas Prácticas de Manufactura” BPM (o GMP por sus siglas en inglés) en la industria farmacéutica se logra cumplir con dichos objetivos. Estas normativas son universales y decisivas en la calidad de los medicamentos. En México se emplea la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas Practicas de fabricación de medicamentos.

La presencia de entidades físicas, químicas o biológicas indeseables en los productos farmacéuticos es un factor importante en el incumplimiento de la calidad ya que pueden generar contaminación, deterioro o alteración en los productos. Por ello es de suma importancia implementar procedimientos de limpieza y sanitización en áreas, material y equipo de la industria farmacéutica empleados para la fabricación de medicamentos; así como la descripción detallada de su preparación, se debe establecer un rol de los agentes sanitizantes cuya eficacia haya sido demostrada y aprobada por la unidad de calidad.

Los procesos de sanitización en general, se ven afectados por aspectos como: Tipo de microorganismos presentes en el ambiente, temperatura, pH del producto sanitizante, edad de la célula y tiempo de exposición; con base a la interacción de estos factores se toma la decisión de la clase de agente a utilizar. Una gran variedad de agentes sanitizantes se usan para eliminar los microorganismos, es importante realizar una evaluación teórico -práctico con el fin de obtener el adecuado sanitizante que se va a emplear.[1-4]

CAPITULO I

Antecedentes:

1.1 Contaminación en la industria farmacéutica

La contaminación es definida como, la presencia de partículas no viables y partículas viables de naturaleza física, química o biológica indeseables. [1]

La presencia de contaminantes microbianos en los productos farmacéuticos dependerá de su composición, estado físico y estándares de control. Por ejemplo, las formas farmacéuticas líquidas y semisólidas son más propensas al ataque microbiano, sobre todo por su contenido de agua y por la presencia de excipientes que son a menudo buenos medios de cultivo.[2]

La contaminación de los productos farmacéuticos se da por microorganismos patógenos que representan un peligro potencial para la salud de los pacientes o generan alteraciones en la estabilidad física y química de los medicamentos por la ruptura enzimática de agentes espesantes y tensoactivos comprometiendo con ello su eficacia. [2-3]

Los cambios más comunes provocados por contaminación microbiológica son:

- Turbidez de las soluciones
- Malos olores
- Cambios de color
- Inestabilidad de las formas farmacéuticas
- Pérdida de actividad farmacológica
- Posibilidad de infección directa por patógenos
- Elevada toxicidad por deshechos metabólicos de los microorganismos

Sin embargo, los invasores iniciales pueden alcanzar concentraciones elevadas sin producir efectos visibles y su presencia puede pasar inadvertida desencadenando efectos sumamente peligrosos. [2-5]

Se necesitan áreas limpias, para el proceso de fabricación de cualquier forma farmacéutica pero las demandas son más estrictas para los productos estériles, donde se requiere libre de microorganismos viables, pirógenos y partículas, además para productos orales se persigue la ausencia de patógenos y un bajo número de microorganismos viables. [2-4]

1.1.1 Fuentes e incidencia de la contaminación

Los productos farmacéuticos pueden ser contaminados en diferentes puntos de la línea de fabricación, a través de sus ingredientes, fármacos, excipientes, el agua usada durante el proceso, los componentes del empaque, el entorno de fabricación, los equipos de procesamiento y el personal que esté a cargo de la fabricación de productos farmacéuticos. En la figura 1.1 se ilustra los factores que intervienen en la línea de fabricación. [5-8]

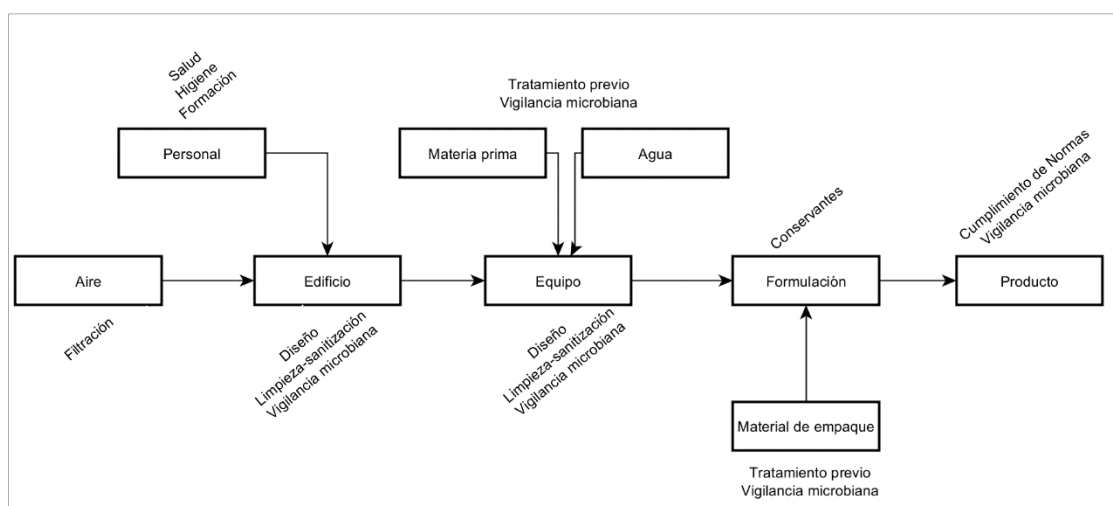


Figura 1.1 Factores que intervienen en la fabricación higiénica

En el ambiente general, los microorganismos no se encuentran flotando libremente en el aire sino que son aerotransportados de un sitio a otro unidos a las partículas de polvo, escamas de piel, gotas de saliva, entre otros. La microflora contaminante son principalmente las esporas aerotransportadas tanto de bacterias como de hongos, levaduras naturales, habitantes anaerobios del suelo y la tierra como los clostridios. [8]

El personal representa la principal fuente de contaminación y se puede evitar en gran medida al apegarse a los procedimientos adecuados de operación e indicaciones de los superiores, por lo que debe ser personal capacitado y calificado para determinados procesos críticos a los que están destinados. Entre los microorganismos que pueden diseminarse de esta manera se encuentran los *Staphylococcus*, presentes sobre todo en piel y ventanas nasales de personas sanas, *Streptococcus* que existen en la garganta y algunas Enterobacterias, como *Salmonella* y coliformes, que habitan en los intestinos.[9]

Se debe tener especial atención en la manipulación y obtención de las materias primas y el agua de partida, ya que es imposible conseguir un producto de calidad si se parte de materia prima no conforme. Los microorganismos habitualmente presentes en el agua son de tipo *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Alcaligenes*. [10-12]

Es importante considerar todos los procedimientos de limpieza, sanitización, operación, transporte y almacenamiento adecuados para evitar que el producto se contamine a causa de materiales y equipo con los que ésta en contacto. En la tabla 1.1 se detallan las fuentes de contaminación microbiana. [10-12]

Tabla 1.1 Fuentes de contaminación microbiana.

Agua	Grupos de gramnegativos poco exigentes: <i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthamonas</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Achromobacter</i>
Aire	Esporas de mohos: <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> Esporas bacterianas: <i>Bacillus spp.</i> Levaduras
Materias Primas Pigmentos Almidones Productos de origen animal Gomas	<i>Clostridium spp.</i> <i>Salmonella</i> Coliformes <i>Achnomyces</i>
Personal	<i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Corynebacteria</i> Coliformes

1.1.2 Prevención y control de la contaminación microbiana

En la Norma Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas para fabricación de medicamentos, se establecen una serie de lineamientos con el objetivo de garantizar la calidad, efectividad y seguridad de los medicamentos para consumo humano. Dentro de estos lineamientos se establecen los requisitos mínimos que se deben cumplir para prevenir la contaminación microbiana.

Las áreas de producción se clasifican acorde al proceso que se realiza y están físicamente separadas entre sí, lo que implica diferentes parámetros de control microbiológico. En la tabla 1.1.1 se muestra la clasificación de áreas de fabricación clase Iso y los parámetros a considerar[1]

Tabla 1.1.1 Parámetros de control microbiológico en áreas clase ISO.

Clasificación	Ejemplos de procesos	Partículas viables	Vestimenta
		(UFC)	
ISO-Clase 5	Operaciones asépticas.	$\leq 1/m^3$ $\leq 1/\text{placa a}$ $\leq 1/\text{huella b}$	Overol, escafandra, goggles cubrezapatos y guantes, estériles
ISO-Clase 6	Esclusas y vestidores para áreas ISO-Clase 5.	$\leq 10/m^3$ $\leq 5/\text{placa a}$ $\leq 5/\text{huella b}$	Igual que en ISO-Clase 5
ISO-Clase 7	Operaciones para productos con esterilización terminal. Almacenamiento de accesorios para formas farmacéuticas estériles.	$\leq 100/m^3$ $\leq 50/\text{placa a}$	Uniforme de planta limpio; cabello, vello facial y corporal cubierto, cubrebocas y guantes
ISO-Clase 8	Preparación y envasado primario de formas farmacéuticas no estériles. Muestreo, pesado y surtido de insumos no estériles.	$\leq 200/m^3$ $\leq 100/\text{placa a}$	Uniforme de planta limpio; cabello, vello facial y corporal cubierto, cubrebocas y guantes
ISO-Clase 9	Acondicionamiento secundario.	N/A	Uniforme de planta limpio; cabello cubierto.

Nota:

- a) Placa de sedimentación de 90 mm de diámetro, con exposición no menor a 30 minutos y no mayor a 4 horas o al tiempo validado; durante todo el tiempo que dure la operación.
- b) Muestreo microbiológico de 5 dedos de los guantes.

Todas las áreas deben cumplir con un tamaño, diseño, construcción y ubicación, para efectuar un proceso lógico, secuencial y permitir su limpieza, sanitización, esterilización o descontaminación cuando se requiera. [2]

Se tiene que acondicionar las áreas según sus necesidades, con acabados sanitarios, ventilación, filtros, sistema de extracción y colección de polvos. [1-2]

El equipo de fabricación debe ser diseñado y localizado para cumplir con el uso propuesto y evitar riesgo de contaminación, debe permitir su desmontaje/montaje, limpieza, mantenimiento y esterilización sin poner en riesgo la calidad de los productos. [1-2]

Debe existir un protocolo de limpieza, sanitización y esterilización cuando aplique para áreas, equipos y materiales. En él se debe establecer el procedimiento, insumos a utilizar, agentes sanitizantes empleados, concentración de uso, modo de preparación, rol, periodicidad y vigencia. Todos ellos deben ser previamente validados. [1-2]

1.2 Sanitización

Acción de eliminar o reducir los niveles de partículas viables por medio de agentes físicos o químicos, posterior a la actividad de limpieza. nom59

Se emplean sobre objetos inanimados, suelos, mesas, superficies de bancos, paredes, entre otros. Su importancia radica en el control de infecciones en hospitales, instalaciones médicas, industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos. [12-14]

Los sanitizantes químicos pueden conseguir la supresión del desarrollo de los microorganismos presentes y la destrucción parcial o completa de un grupo indeseable en específico. Esto depende del efecto que cause frente a cepas microbianas. De esta manera podemos emplear una clasificación de los sanitizantes en: 1) agentes estáticos, 2) agentes biocidas y 3) agentes líticos.[14-13]

Los agentes estáticos impiden el desarrollo y diseminación de las bacterias; suelen ser inhibidores de la síntesis de proteínas y actúan uniéndose a los ribosomas, es una unión débil, si disminuye la concentración del agente se libera de los ribosomas y se reanuda el crecimiento. En la figura 1.2 se muestra el efecto de un agente estático frente al crecimiento microbiano.[15-18]

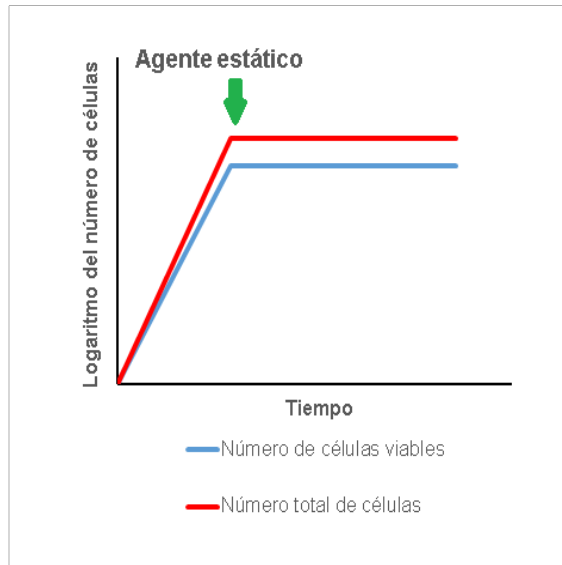


Figura 1.2 Efecto estático frente al crecimiento microbiano

Los agentes bioicidas se unen fuertemente a sus células diana, provocan la muerte de la célula y no se eliminan por dilución. Las células muertas no se destruyen y el número de células se mantiene estable. En la figura 1.2.1 se ilustra el efecto de los agentes bioicidas frente al crecimiento microbiano. [20]

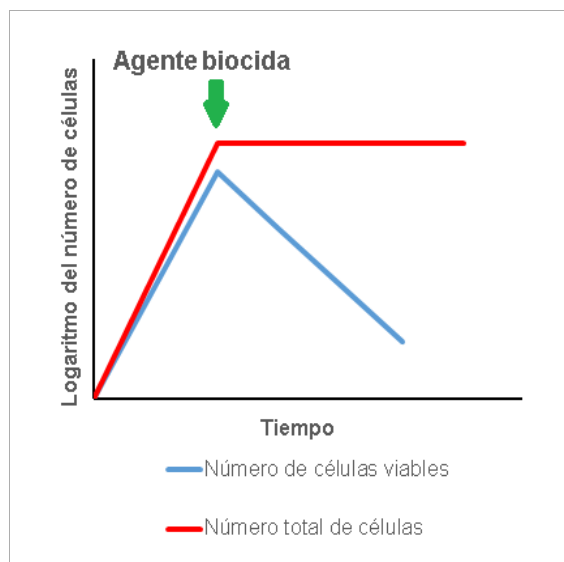


Figura 1.2.1 Efecto biocida sobre el crecimiento microbiano

Los agentes líticos provocan la muerte celular por lisis y liberación de contenido citoplasmático. La lisis causa una reducción del número total de células. En la figura 1.2.2 se ilustra el efecto de un agente lítico sobre el crecimiento microbiano. [20]



Figura 1.2.2 Efecto lítico sobre el crecimiento microbiano.

1.2.1 Selección de sanitizantes

Muchas sustancias químicas son capaces de inhibir o eliminar microorganismos; sin embargo, no existe un producto que sea capaz de convertirse en el agente químico ideal para el control microbiológico, porque debe cumplir una serie de propiedades que son prácticamente imposibles de reunir en uno solo. 0.4

En el proceso de selección de desinfectantes para uso en el entorno de fabricación de productos farmacéuticos, debe ser minucioso, se tienen que evaluar los factores intrínsecos y extrínsecos. [1,21-22]

Los factores intrínsecos se refieren a las características propias del producto como son: [23-25]

- Descripción del producto. Permite evaluar las características físicas como el color, olor, aspecto, solubilidad, homogeneidad, presentación y cantidad de producto por unidad de envase y sus indicaciones de uso.
- Ingrediente activo. Característica que permite conocer el nombre genérico del producto, principio activo y su contenido en el producto.
- Actividad antimicrobiana. Es la capacidad que tiene el producto para eliminar microorganismos. Deben considerarse los niveles de desinfección esperados: alto, intermedio o bajo.

- Tiempo de acción. Tiempo de exposición requerido para que el producto cumpla con el objetivo.
- Almacenamiento y Estabilidad. El proveedor debe proporcionar las indicaciones y condiciones de almacenamiento y establecer el tiempo de vigencia durante el cual el producto permanece activo.
- Forma y campo de aplicación. Recomendaciones acerca del modo de empleo en referencia al campo en el que se requiera emplear.
- Aspectos económicos. Relación costo-beneficio. El costo debe evaluarse en relación con la dilución, el rendimiento y la seguridad.
- Eliminación y deshecho: Las formas de la inactivación del producto sanitizante para su eliminación, garantizando la inocuidad del producto frente al medio ambiente.
- Datos de seguridad. Relacionados con los factores de riesgo que se generan durante el manejo del producto.

Los factores extrínsecos afectan directa o indirectamente la efectividad del producto sanitizante y tiene que ver con:

- Número y tipos de microorganismos a controlar. Se evalúa y comprueba la acción del producto sanitizante frente a microorganismos que se desee atacar.
- Naturaleza del material o superficie a descontaminar. Se relaciona con los efectos adversos que pueda tener el producto sobre los materiales, equipos, superficies o tejidos en los que se aplica o que entran en contacto con el mismo.
- Condiciones ambientales. Se requiere conocimiento de la influencia que ejercen sobre él la temperatura, pH y la materia orgánica presente.

Por los aspectos anteriores resumimos que el sanitizante más próximo al ideal debe cumplir con lo siguiente:

- Tener un amplio espectro de acción
- Tener un alto grado de efectividad a bajas concentraciones
- Ser de fácil acceso y uso
- Ser soluble en agua
- Ser económico

- Ser estable: tiempo prolongado de vida útil.
- No debe reaccionar con materia orgánica ni inactivarse en presencia de ella.
- Escasa o nula toxicidad para el ser humano.
- Acción rápida.
- Capacidad de penetración.
- Compatible con todos los materiales.
- Ser agradable con el medio ambiente
- Estar avalado por las autoridades competentes

1.2.2 Alcohol isopropílico

Conocido como isopropanol, 2-propanol de fórmula química $(\text{CH}_3)_2 \text{CHOH}$ cuya estructura se ilustra en la figura 1.2.3. Es líquido, incoloro volátil, inflamable y con un olor característico, miscible en agua, etanol, éter y cloroformo.

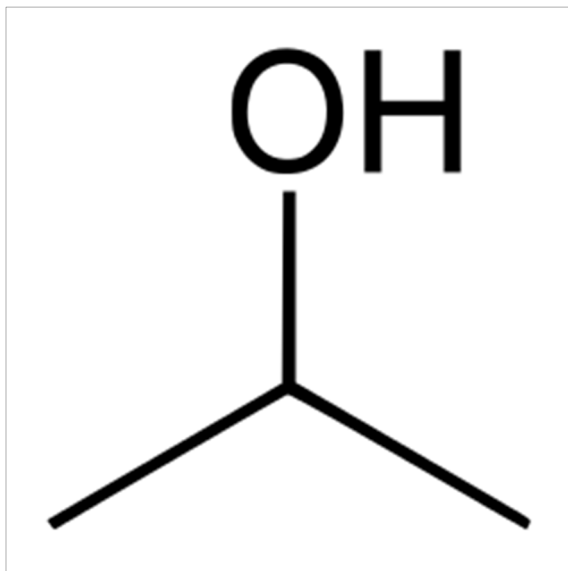


Figura 1.2.3 Estructura química 2-propanol

Su actividad es bactericida y bacteriostática, posee un poder disolvente frente a los lípidos lo que facilita la penetración intracelular, genera cambios en la permeabilidad de la membrana, inactivación de las enzimas y desnaturalización de proteínas esenciales, mediante tres etapas: [24]

- Absorción por los lipoides de la pared
- Degradación de la membrana citoplasmática
- Coagulación de proteínas y enzimas

Es efectivo contra bacteria gram positivas, gram negativas, micobacterias, presenta baja actividad frente hongos y levaduras y no es esporicida.

Su actividad aumenta a mayor presencia de agua, por lo que el máximo de eficacia lo poseen las soluciones de 60-80%, y disminuye en presencia de suciedad o agentes oxidantes.

Disuelve las grasas, es buen agente limpiador en zonas aceitosas, penetra y se difunde en diversos materiales, por ello se emplea en los programas de higiene para la remoción de residuos, sanitización de paredes, pisos, mesas, equipos, utensilios y mesas, guantes e incluso en superficies más críticas por su habilidad de rápida evaporación.

1.2.3 Hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio (cuya disolución en agua es conocida como lejía) es un sanitizante químico, fuertemente oxidante de fórmula NaClO , la cual se ilustra en la figura 1.2.4

Es buen desinfectante a una concentración de 1%, siempre que se haya realizado la limpieza previa debido a que es neutralizado por la presencia de materia orgánica. En concentraciones elevadas resulta ser corrosivo para instrumental metálico, por lo cual su uso es restringido a la sanitización de paredes, pisos y desinfección de agua. Su acción sanitizante se incrementa a temperaturas altas, pero implica la formación de trihalometano, un compuesto altamente cancerígeno. [24-27]

Las soluciones de Hipoclorito de sodio son claras de ligero color verde a amarillo y un olor característico. Son empleadas como desinfectantes, blanqueadoras y desodorantes.

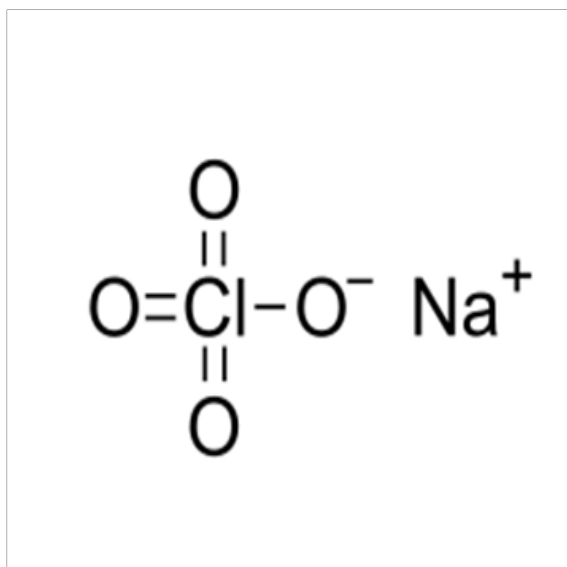


Figura 1.2.4 Estructura química de Hipoclorito de sodio

Tiene amplio espectro de acción, posee actividad contra bacterias gram positivas, gram negativas, micobacterias, es esporicida, fungicida y virucida.

El hipoclorito sódico, al disolverse en agua, origina los siguientes compuestos clorados, predominando uno u otro en función del pH de la solución.

- Ion hipoclorito (OCL); predomina a pH alcalino
- Ácido hipocloroso (HOCl); predomina a pH alcalino
- Cloro gaseoso (Cl₂); predomina a pH alcalino

El ácido hipocloroso es la forma biocida más eficaz que el ion hipoclorito, es un oxidante fuerte no selectivo altamente destructivo, que actúa principalmente en la membrana celular de los microorganismos generando cambios en la permeabilidad, afecta el transporte de sustancias, fragmenta las proteínas y reacciona con los nucleótidos, inhibiendo enzimas esenciales por oxidación de grupos S-H. [28]

1.2.4 Desfan-100

Compuesto orgánico complejo obtenido de semillas de naranja y toronja, su nombre químico es Polisacárido ácido de fórmula empírica C₆H₅O₄CH₂N(CH₃)₂RCL. El ingrediente activo está integrado por: ácido ascórbico, ácido palmítico, ácido cítrico,

fracciones de glucosa y fructuosa, estabilizado con la adición de agua y glicerina. En la figura 1.2.5 se ilustran los componentes activos de Desfan-100. [28-30]

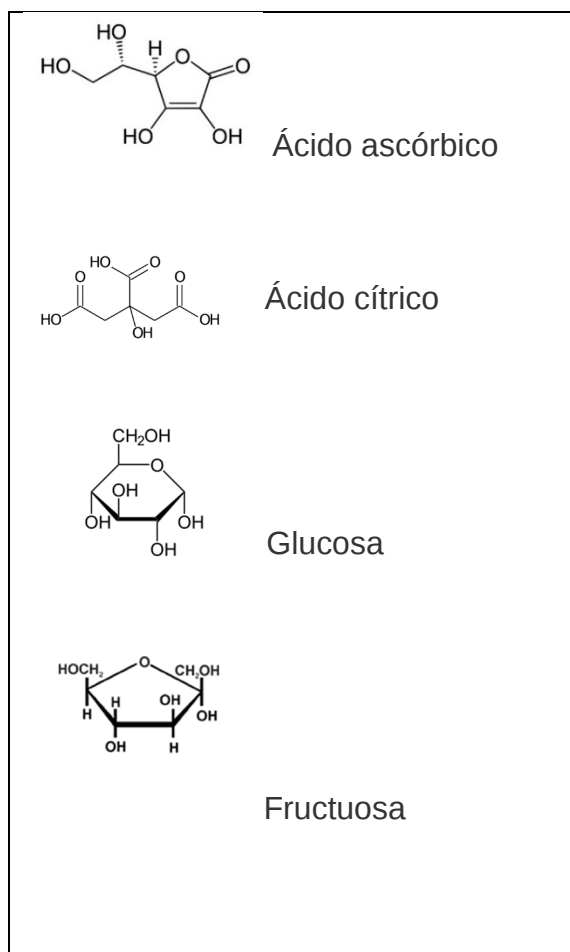


Figura 1.2.5 Compuestos activos de Desfan-100

Es ligeramente viscosa, de color ámbar oscuro, sabor astringente, generan espumas debido a los ácidos grasos del activo y las sales disueltas en agua forman miscelas, tiene efecto sanitizante, desodorizante, antioxidante y no es corrosivo.

Presenta efecto bacteriostático u oleodinámico, actúa por contacto directo al penetrar la pared celular del microorganismo y hacerla estallar por presión, genera cambios en la permeabilidad de la membrana, inactiva enzimas esenciales, impidiendo de este modo la multiplicación y la aparición de cepas resistentes.

Tiene alta penetración, actúa frente bacterias gram positivas, gram negativas, esporas, micobacterias, hongos, levaduras y algas.

Se emplea para la sanitización de áreas en general, pisos, paredes, techos, equipos de proceso, mesas utensilios y agua. Puede permanecer con un porcentaje de eficiencia de 80-100% hasta por 3 días gracias a su efecto residual, su acción no se ve afectada por ácido o álcalis, es estable a rangos amplios de acidez pH 2-12, es estable a la luz y resiste altas temperaturas.

1.2.5 Cloruro de benzalconio

Sal orgánica perteneciente al grupo de compuestos de amonio cuaternario, conocido como mezcla de cloruro de alquil benzildimetilamonio. Su estructura química se ilustra en la imagen [30]

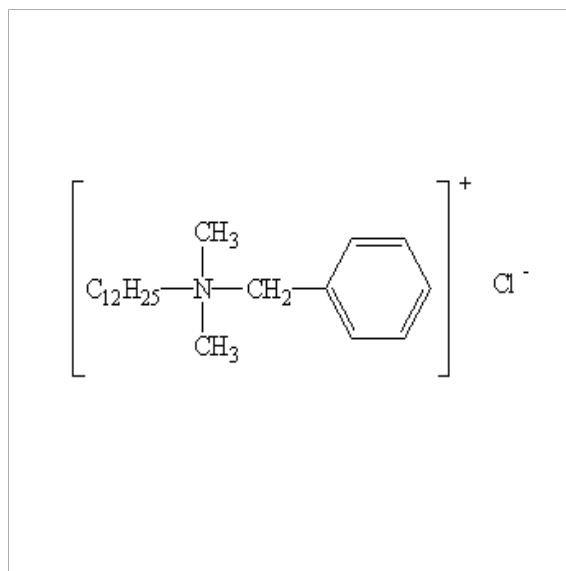


Imagen 1.2.6 Estructura química de Cloruro de benzalconio

Es un sanitizante de tipo bactericida no oxidante, que puede controlar la propagación de bacterias, también tiene efectos desengrasante, desodorizante e inhibidor de la corrosión. Las soluciones de cloruro de benzalconio son líquidas, transparente incoloro a amarillo pálido.

Se consideran sanitizantes de bajo nivel, su actividad es más rápida y elevada frente a bacterias gram positivas que frente a gram negativas, tienen baja actividad frente a hongos y levaduras y pueden actuar como esporoestáticos sin ser esporicidas. Se han reportado resistencias en *Staphylococcus aureus* resistentes a metacilina, *Pseudomonas aeruginosa* y algunas enterobacterias que pueden llegar a contaminar las soluciones.

Su actividad se debe a su naturaleza anfipática, posee la capacidad de penetración gracias a las cadenas carbonadas (hódrofobas) mientras que a través del nitrógeno catiónico (hódrófilo) interactúa con los fosfolípidos causando una alteración de la membrana celular, con ello salida de material citoplasmático, desnaturalización de proteínas, inactivación de enzimas y procesos metabólicos, generando finalmente la lisis celular.

Tienen actividad corrosiva hacia metales por lo que su uso se limita para la sanitización de pisos, paredes, muebles y algunos equipos y utensilios resistentes. Su acción es mayor en condiciones alcalinas en un rango de pH de 7-10 y disminuye en presencia de agua dura y materia orgánica, por lo que es preferible preparar las soluciones con agua grado AFI y limpiar las superficies antes de aplicarlas

En la tabla 1.2 se hace un comparativo de la actividad sanitizante frente a los grupos microbianos de interés. [15]

Tabla 1.2 Actividad de sanitizantes

Sanitizantes	Microorganismos					
	Gram-positivas	Gram-negativas	Micobacterias	Esporas	Mohos	Levaduras
Alcohol isopropílico	+++	+++	++	0	+	+
Hipoclorito de sodio	+++	+++	++	++	++	++
Desfan-100	+++	+++	+	+	+	+
Cloruro de benzalconio	+++	++	0	0	+	+

+++ Muy buena actividad

++ Buena actividad

+ Actividad media

0 Actividad nula

1.3 Microorganismos

En condiciones normales , es posible obtener diversas cepas de una sola especie a partir de colecciones de cultivos como la National Collection of Industrial and Marine Bacteria o la National Collection of Type Cultures empleadas para la producción, la investigación y desarrollo de vacunas, así como de referencia destinadas a evaluar la calidad de los medios de cultivo y los sanitizantes, el aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayos y la validación de ensayos microbiológicos de control de calidad.[30-34]

Sin embargo es de gran utilidad emplear cepas aisladas del ambiente a estudiar ya que muestran variaciones frente a las cepas puras obtenidas de las colecciones, en las que intervienen factores ambientales en los que se encuentran.

Para el presente trabajo se empleó 6 microorganismos para el desafío de sanitizantes, cinco de ellos corresponden a cepas estándar ATCC y el ultimo a un microorganismo aislado a partir del monitoreo ambiental en áreas de fabricación y previamente identificado. La elección de los microorganismos fue en consideración a lo establecido en la USP 2008, con el propósito de abarcar la mayoría de los grupos bacterianos.

Las cepas microbianas se enlistan a continuación:

- *Escherichia coli* ATCC 11229
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCCC 9027
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404
- *Acinetobacter lwoffii* (Aislamiento ambiental)

1.3.1 *Staphylococcus aureus*

Células esféricas con reacción positiva al gram que se pierde en cultivos viejos, se disponen en racimos, no son formadores de esporas, carecen de flagelos y movilidad. Sobre medios sólidos las colonias son redondas, lisas, prominentes, brillantes, de color blanco que con el tiempo producen pigmento amarillo intenso. En la figura 1.3 podemos apreciar, a) morfología colonial de *S. aureus* en medio método estándar, b) morfología microscópica. [15-20]

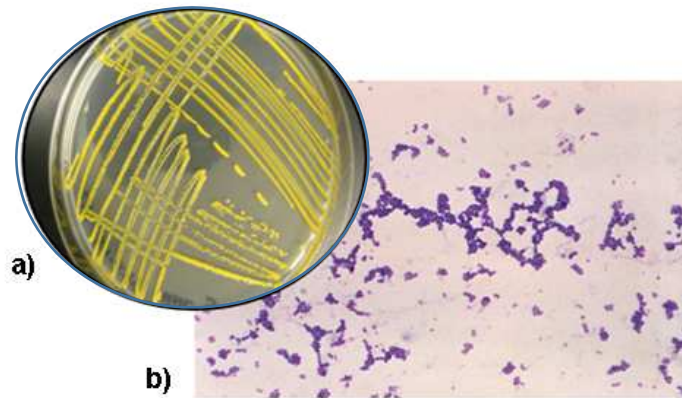


Fig. 1.3 Morfología colonial y microscópica *S. aureus*

Tienen crecimiento rápido a condiciones aerobias y anaerobias entre 18-40°C y altas concentraciones de sal. Son metabólicamente activos fermentadores de carbohidratos, catalasa y coagulasa positivas.(Murray-guia medica-brocks)

Están difundidos en la naturaleza, superficies, aire, suelo y agua. En el hombre se encuentra generalmente en las fosas nasales y en ocasiones en la piel o en la ropa, y de estos sitios puede transmitirse a otras regiones del cuerpo o membranas mucosas. (5.5-murray-ruan-5.6)

La infección puede resultar del contacto directo con heridas o mucosas, a través de materiales o productos contaminados, inhalación y por ingestión de la bacteria o sus toxinas.(5.6-brooks-guia-murray-5.5-)

Posee un alto grado de patogenicidad, es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produce procesos infecciosos en piel, heridas, tejidos blandos, y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones sistémicas en sistema nervioso central, respiratorio o genitourinario. Es una causa frecuente de bacteriemia, lo que puede desencadenar infecciones profundas como osteomielitis, endocarditis, artritis séptica, meningitis, conjuntivitis, entre otras.(guía)

Provoca intoxicación por consumo de productos contaminados con sus enterotoxinas preformadas y produce el síndrome del shock tóxico al liberar superantígenos en el torrente sanguíneo. En la tabla 1.3 se enlistan la patología de *S. aureus*.([15-18])

Tabla 1.3 Patología de *S. aureus*

Patología			
➤ Impétigo	➤ Sinusitis	➤ Peritonitis	➤ Miositis
➤ Forúnculo	➤ Otitis	➤ Intoxicación	➤ Endocarditis
➤ Foliculitis	➤ Faringitis	➤ Meningoencefalitis	➤ Pericarditis
➤ Celulitis	➤ Neumonitis	➤ Cistitis	➤ Conjuntivitis
➤ Abscesos	➤ Enterocolitis	➤ Abscesos en	➤ Septicemia
➤ Artritis	➤ Osteomielitis	hígado y pulmon	➤ Choque
➤ Nefritis	➤ Prostatitis		endotóxico

S. aureus produce una gran variedad de proteínas que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades en el ser humano. Son un gran número de factores de virulencia, que se dividen en tres categorías en base a su función: 1) adherencia a la célula huésped o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa; 2) evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas, proteína A, lipasas, y polisacáridos capsulares; 3) invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como la toxina α , hemolisinas β , γ y δ . En la tabla 1.3.1 se muestra una clasificación de los factores de virulencia de *S. aureus* teniendo en cuenta si forman parte estructural de la bacteria o si son enzimas o toxinas. [15-18]

Tabla 1.3.1 Factores de virulencia de *S. aureus*

Estructurales	Enzimas	Toxinas
➤ Peptidoglucano	➤ Catalasa	➤ Hemolisina α , β , γ , δ
➤ Proteína A	➤ Hialuronidasa	➤ Enterotoxinas estafilocócicas
➤ Factores de adhesión	➤ Lipasas	➤ Toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1)
➤ Ácidos teicoicos	➤ Coagulasa	➤ Toxinas exfoliativas (ETA y ETB)
➤ Polisacáridos capsulares	➤ Nucleasas	
	➤ Proteasas	
	➤ Estafilocinasa	
	➤ Colagenasa	

1.3.2 *Escherichia coli*

Células en forma de bacilos aislados gramnegativos no esporulados, móviles, poseen, pilis, fimbrias, muchos de ellos forman microcápsula. Son aerobios facultativos, oxidasa negativa, indol, descarboxilasa de lisina y lactosa positivos con producción de gas. [15-18]

Tienen crecimiento rápido en agar McConkey donde forman colonias medianas, regulares de color rojo a rosado con halo turbio, en agar E.M.B. (eosina y azul de metileno) presentan un centro grande de color oscuro e incluso negro, y tienen brillo verde metálico cuando se observan con luz refleja. En la figura 1.3.1 se ilustra la morfología colonial y microscópica de *E. coli*. [20]

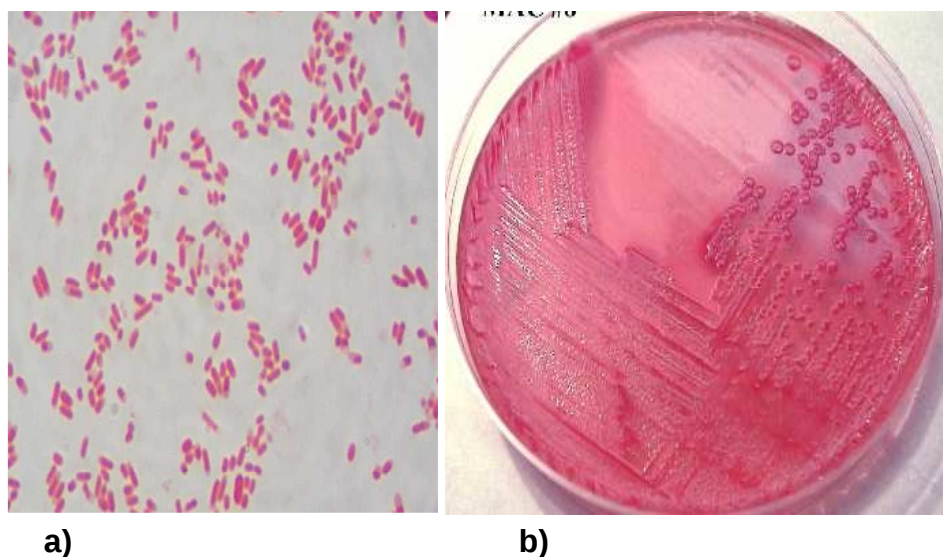


Figura 1.3.1 *E. coli*. a) Morfología colonial en agar Mc Conkey, b) Morfología microscópica.

Forman parte de la flora normal del tubo digestivo en hombres y animales, por ello es indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos. Se encuentra en calidad de saprobio sin causar daño, por el contrario muchas cepas producen sustancias benéficas para el hospedero como las colicinas, que tienen efecto inhibitorio sobre otras cepas potencialmente patógenas[15-18]

Las infecciones causadas por cepas patógenas de *E. coli* desarrollan principalmente cuatro síndromes clínicos: 1) infecciones gastrointestinales, 2) Infecciones genitourinarias, 3) sepsis y 4) meningitis. [16-24]

Los grupos causantes de gastroenteritis son: *E. coli* enterotoxígenica (ECET), *E. coli* enteroptógena (ECEP), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) y *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), cuyos poseen diferentes propiedades de virulencia. En la tabla 1.3.2 se resume los factores de virulencia asociados a gastroenteritis. [24-27]

Las infecciones gastrointestinales se adquieren fundamentalmente por el consumo de agua, alimentos y productos contaminados. Se caracterizan por ciclos diarreicos, secreción y afección al intestino. [24-27]

Tabla 1.3.2 Factores de virulencia en *E. coli* asociados a gastroenteritis.

Bacteria	Adhesinas	Exotoxinas	Patogenia
ECET	Antígenos del factor de colonización (CFA/I,II,III)	(LT-1) termolábil (STa) termoestable	Hipersecreción de líquidos y electrolitos
ECEP	Pili		Malabsorción y diarrea
ECEA	Fimbrias adherentes agregantes (AAF/I,II,III)	(EAST) termoestable enteroagregante (Pet) codificada por plásmidos	Infiltración mononuclear
ECEH	Bfp; intimina	Toxinas de Shiga (Stx-1, Stx-2)	Malabsorción
ECEI	Antígeno del plásmido invasivo (Ipa)	Hemolisina (HlyA)	Destrucción de células del colon

El síndrome infeccioso genitourinario es causado por *E. coli* uropática, se originan en el colon, ascienden por vejiga y pueden migrar a riñón o próstata. Su mecanismo se relaciona con factores de virulencia, como hemolisina alfa, en conjunto con la adherencia a las células epiteliales mediada por pilis. El mal tratamiento y avance de las infecciones gastrointestinales o genitourinarias pueden desencadenar en cuadro séptico. [34]

E. coli es responsable de meningitis neonatal cuya colonización se da desde la vagina a causa de la ruptura de las membranas amnióticas o durante el parto. Más del 75% de los casos se debe a cepas que poseen el polisacárido capsular K1.ryan-murra

1.3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Bacilos gramnegativos, delgados, rectos o ligeramente curvos, dispuestos en parejas, poseen movilidad, flagelo y fimbrias.

En medios sólidos desarrolla colonias planas de aspecto mucoso, con bordes que se extienden, adoptan un resplandor metálico y emiten olor a frutas. Produce piocianina y fluoresceína que combinadas generan un color verde brillante. En la figura 1.3.2 se ilustra la morfología colonial y microscópica de *P. aeruginosa*

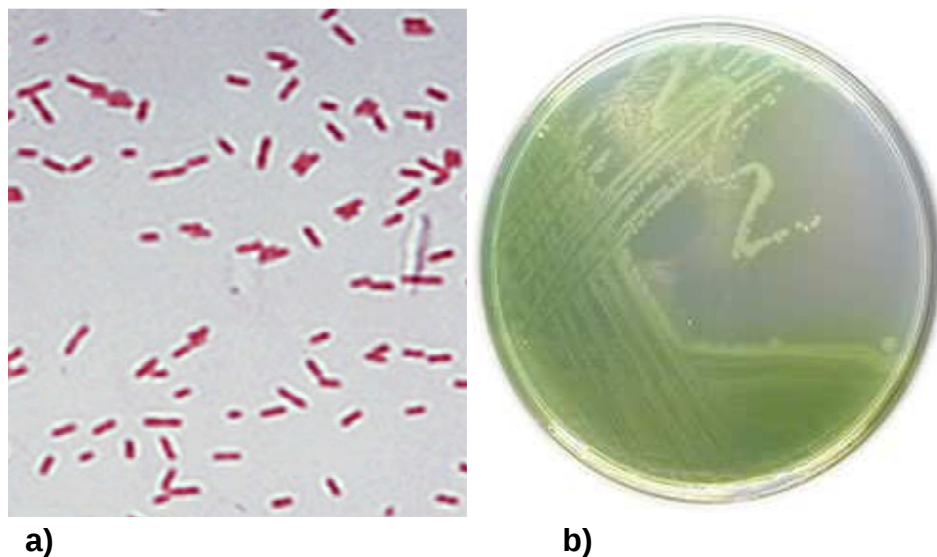


Figura 1.3.2 *P.aeruginosa*. a) Morfología colonial. B) Morfología microscópica

Su crecimiento y necesidades energéticas son variables, emplea los carbohidratos mediante respiración aerobia donde el oxígeno es el aceptor final de electrones, y en condiciones anaerobias utiliza moléculas simples (amoníaco, CO₂) como únicas fuentes de N y C. Puede crecer en un amplio rango de temperatura de 20-40°C primordialmente en condiciones húmedas. Se encuentran en el suelo, agua, compuestos orgánicos en descomposición y vegetación. Se observa escaso número en la flora normal de intestino y sobre la piel del hombre.

Es patógeno en condiciones desprovistas de defensas normales, a través de heridas, traumas, por inhalación o contacto directo con medicamentos e instrumentos quirúrgicos contaminados. Las bacterias se unen a las mucosas y piel, las colonizan, invaden localmente y producen enfermedades sistémicas.

Las enfermedades incluyen infecciones respiratorias, urinarias, en piel, tejidos blandos, oculares, auditivos, gastrointestinales, bacteriemia y septicemia. En la tabla 1.3.3 se enlistan algunas afecciones causadas por *P. aeruginosa*

Tabla 1.3.3 Patología *P. aeruginosa*

Patología		
➤ Cistitis	➤ Otitis	➤ Absceso cerebral
➤ Dermatitis	➤ Osteomielitis	➤ Neumonía lobal
➤ Pielonefritis	➤ Meningoencefalitis	➤ Septicemia
➤ Gastroenterocolitis	➤ Úlcera corneal	➤ Foliculitis
➤ Endocarditis	➤ Bronconeumonía	➤ Traqueobronquitis

Entre los mecanismos de infección, virulencia y resistencia se encuentran componentes estructurales, toxinas y enzimas: su flagelo, pilis que le permiten la adherencia a superficies, la secreción del polisacárido extracelular alginato, la formación de biofilm, la secreción de exoenzimas, los mecanismos de resistencia antimicrobiana y otros factores de virulencia tales como proteasas y elastasas.^{16,17} Por su gran adaptación fisiológica, su potencial metabólico y mecanismos de virulencia, es considerado como uno de los más importantes patógenos oportunistas.

1.3.4 *Acinetobacter lwoffii*

Cocobacilos gramnegativos, se disponen en pares, agregados, inmóviles. En medios solidos forman colonias convexas, pequeñas, con una tenue coloración rosa. En la figura 1.3.3 se ilustra la morfología colonial y microscópica de *A. lwoffii*.

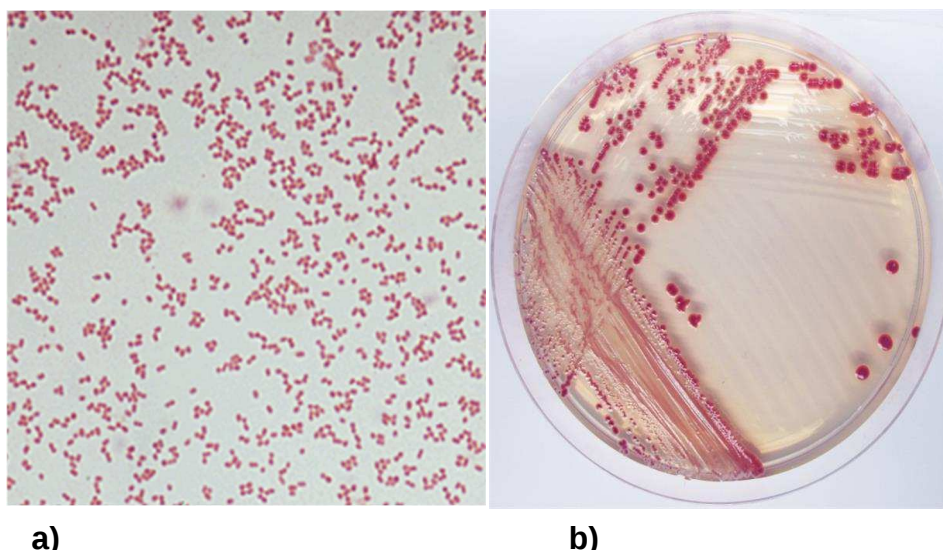


Figura 1.3.3 A. Iwoffii. a) Morfología colonial, b) Morfología microscópica

Son aerobios estrictos, oxidasa, citocromo y producción de ácido negativos, son incapaces de fermentar carbohidratos y de reducir nitratos a nitritos.

Crecen como saprofitos ubicuos en la naturaleza, suelo, agua y el entorno hospitalario, principalmente en superficies húmedas, equipos de terapia respiratoria, jabones, cremas y lociones. Forman parte de la micro flora natural de la piel, bucofaringe y en ocasiones como comensales en vagina.

Son patógenos oportunistas que pueden producir infecciones en la piel, heridas, tejidos blandos, aparato respiratorio, urinario y esporádicamente causan septicemia. En la tabla 1.3.4 se enlistan algunas de las afecciones causadas por *A. Iwoffii*.

Tabla 1.3.4 Patología A. Iwoffii

Patología		
➤ Meningitis	➤ Osteomielitis	➤ Septicemia
➤ Osteomielitis	➤ Úlcera corneal	➤ Neumonía
➤ Peritonitis	➤ Infección de piel y	➤ Endocarditis
➤ Conjuntivitis	heridas	

Tienen un bajo grado de virulencia, la infección se da en pacientes inmunodeprimidos, mediante catéter o terapia respiratoria.

1.3.5 *Candida albicans*

Las células de *Candida* crecen como levaduras típicas de 4-6 µm, redondas u ovaladas en gemación. Forman pseudohifas cuando las gemas continúan su crecimiento, pero sin desprenderse, para generar cadenas de células alargadas pinzadas en los tabiques entre las células. Es polimórfica al producir levaduras, pseudohifas e hifas verdaderas.

En medios solidos desarrolla colonias blandas, pálidas, color blanco o marrón. Las pseudohifas se manifiestan como crecimiento bajo la superficie del agar. Su temperatura optima es a 37°C, pero crecen bien a temperatura ambiente 25°C en agar método estándar y en medios especializados como agar dextrosa sabouraud.

La pared celular está formada por una mezcla de polisacáridos manano, glicano y quitina solos o en complejo con proteínas. Una capa fibrilar externa que se extiende a la superficie.

Forma parte de la flora microbiana normal en piel, mucosas, bucofaringe, aparato genital femenino. Es patógeno oportunista en individuos con alteraciones en las barreras inmunes de piel y mucosas que le permiten atravesar, colonizar y reproducirse.

Las infecciones por *Candida albicans* se dan en heridas y piel mediante contacto directo, translocación gastrointestinal, catéteres intravasculares, diseminación hematógena. Su potencial patógeno se debe a la capacidad de adhesión, polimorfismo, hidrofobicidad de su superficie celular, proteasas y fosfolipasas que pueden digerir a las células epiteliales y facilitar la invasión.

Este microorganismo coloniza la mucosa digestiva y pasan al torrente circulatorio mediante un proceso de translocación gastrointestinal, invaden tejidos profundos de diferentes órganos diana afectando riñones bazo, hígado, riñón y corazón.

1.3.6 *Aspergillus brasiliensis*

Mohos de crecimiento rápido, producen hifas aéreas tabicadas, ramificadas y una estructura conidial característica: conidióforos alargados con vesículas terminales sobre las cuales las fialides producen cadenas de conidios. En medios solidos como el agar

dextrosa sabouraud desarrollan colonias esponjadas en uno a dos días y para el quinto día pueden cubrir toda la placa en crecimiento radial con pigmento negro.

Se encuentran en la naturaleza, como pueden subsistir en el suelo, plantas en masetas, materia orgánica en descomposición y pueden adaptarse a un amplio espectro de condiciones ambientales.

La principal vía de infección es la inhalación de conidios transportados por el aire que se asientan en los pulmones, la nasofaringe o los senos. Las formas miceliales pueden invadir tejido, vasculatura de los pulmones, produciendo trombosis y necrosis quística local y puede llegar a ser invasiva. Genera alergias clínicas que se caracterizan por infiltrados pulmonares transitorios.

II. Parte experimental

Para la determinación de la efectividad sanitizante, se empleó el método descrito en la Norma Mexicana NMX-BB-040-SCFI, 1991. Éste se basa en determinar el porcentaje de reducción de un número conocido de microorganismos, cuando se ponen en contacto con un sanitizante, bajo condiciones de prueba específicas.

La parte experimental se realizó en seis etapas: 1) Preparación de soluciones sanitizantes, 2) Estandarización de suspensiones microbianas, 3) Cuenta viable inicial, 4) Desafío de las soluciones sanitizantes, 5) Cuenta de las UFC/mL sobrevivientes y 6) Determinación del porcentaje de reducción en la cuenta inicial. En la figura 2 se muestra un diagrama general de trabajo.

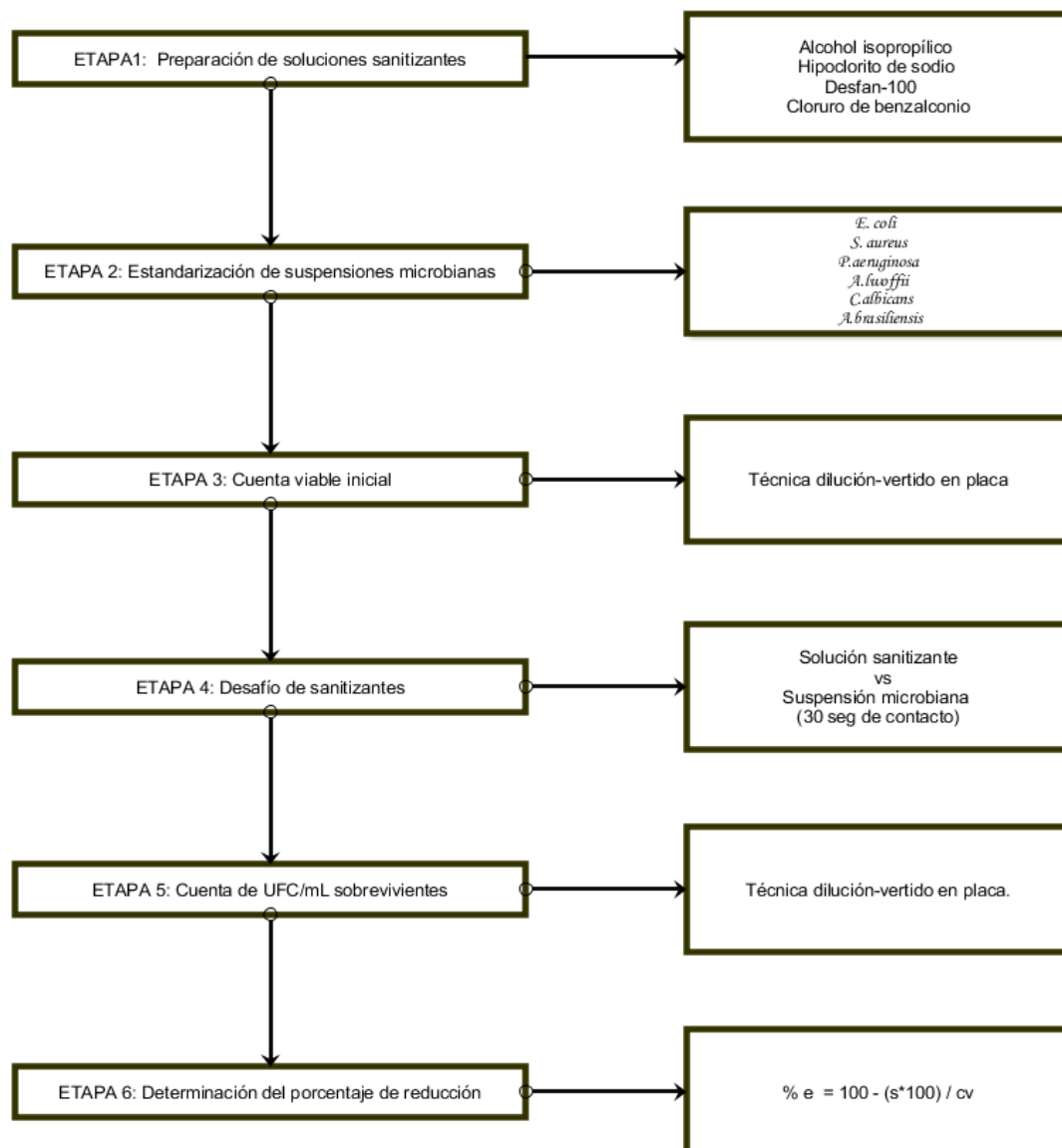


Figura 2. Diagrama general de trabajo.

2.1 Preparación de soluciones sanitizantes

La preparación de las soluciones sanitizantes se llevó a cabo según lo establecido en el PNO-PR-032, Preparación y rol quincenal de sanitizantes para las áreas de producción, vigente en Alvartis Pharma S.A. de C.V.

A partir de la fórmula de dilución Ec.1 se realizó un despeje para conocer el volumen de la solución sanitizante a la concentración comercial necesaria a diluir para obtener un volumen final de 15L para cada solución a la concentración de uso deseada Ec.2. En la tabla 2.1 se detalla los datos empleados para la preparación de soluciones sanitizantes.

Fórmula de dilución

Ec. 1

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Despeje

Ec. 2

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

Donde:

C₁: Concentración comercial

V₁: Volumen de sanitizante comercial necesario

C₂: Concentración de uso deseada

V₂: Volumen final deseado

Tabla 2.1 Preparación de soluciones sanitizantes

Solución sanitizante	Concentración comercial (%)	Volumen de sanitizante utilizado (mL)	Volumen Final (mL)	Concentración final (%)
Hipoclorito de sodio	13	1154	15000	1
Cloruro de benzalconio	80	37.5	15000	0.2
Desfan-100	95	31.5	15000	0.2
Alcohol Isopropílico	99.5	10553	15000	70

2.2 Estandarización de suspensiones microbianas

Se emplearon las siguientes cepas de trabajo para el desafío de sanitizantes en base a lo establecido en la USP 2008.

- *Escherichia coli* ATCC 11229
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCCC 9027
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404
- *Acinetobacter lwoffii* (Aislamiento ambiental)

Se efectuaron dos resiembras en medio inclinado, de Agar Soya Trypticaseína para bacterias; Agar Dextrosa Sabouraud para hongos y levaduras, se incubó durante 24h a 37°C y 25°C respectivamente. A partir de estos cultivos, se preparó una serie de 10 suspensiones con Solución amortiguadora de fosfato 0.25M a diferente turbidez para cada microorganismo.

De cada serie de suspensiones se determinó el número de UFC/mL mediante la técnica descrita en la norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994.

Finalmente se precisó el porcentaje de transmitancia a 580nm, en las suspensiones que se obtuvo una cuenta de 75 a 125 X 10⁸ UFC / mL para cada cepa, según lo establecido en la norma mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999. Estos datos fueron considerados para la preparación del inóculo de prueba.

2.3 Cuenta viable inicial

Se preparó una suspensión microbiana para cada una de las cepas a partir de cultivos de 24 horas y se estandarizó al porcentaje de transmitancia de referencia obtenido en el punto anterior.

A partir de estas suspensiones se cuantificó el número de UFC/mL viables para cada cepa mediante la técnica establecida en la NOM-092-SSA1-1994, la cual se ilustra en la imagen 2.3 y se describe más adelante.

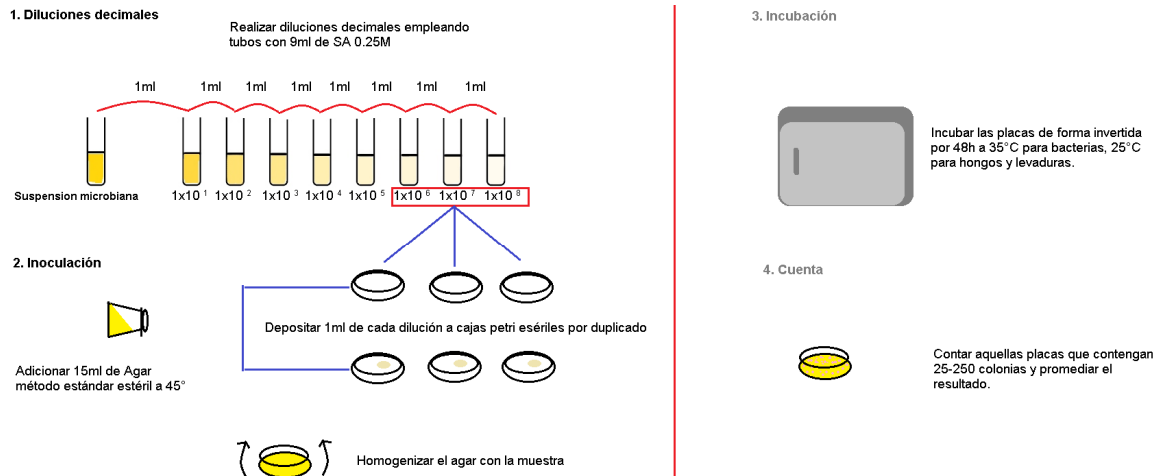


Imagen 2.3 Cuenta de bacterias en placa

Se realizó diluciones decimales de cada suspensión hasta obtener una de 1×10^{-8} , se usó tubos con 9mL de Solución amortiguadora de fosfatos 0,25M.

De la dilución 1×10^{-6} , 1×10^{-7} y 1×10^{-8} correspondiente a cada suspensión microbiana, se inoculó por duplicado a placas Petri estériles 90x15mm. En seguida se agregó 15 mL de agar Método estándar a cada placa y se homogenizo perfectamente. Una vez solidificadas todas las placas se invirtieron con la tapa hacia abajo y se incubaron durante 48h a 37°C bacterias, 25°C hongos y levaduras.

Posterior al tiempo de incubación se seleccionó las placas con 25 a 250 colonias y se calculó el número total de UFC/mL empleando la Ec. 3 considerando el duplicado de cada ensayo.

Ec. 3

$$N = \frac{Xc \cdot Va}{FD}$$

Donde:

N: número de UFC/mL

Xc: Promedio cuenta de colonias

Va: Volumen del inoculo en mL

FD: Factor de dilución

2.4 Desafío de sanitizantes

El desafío se dividió en 4 etapas donde se realizó 3 ensayos para cada solución sanitizante en intervalo de 7 días con el fin de cubrir el periodo de vida estipulado en el rol de sanitizantes según el PNO-PR-032. En la tabla 2.4 se describe las etapas en las que se dividió el desafío de sanitizantes.

Tabla 2.4 Etapas para desafío de sanitizantes

Etapa	Sanitizante	Microorganismos de prueba
I	Alcohol isopropílico al 70%	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>
II	Hipoclorito de sodio al 1%	<i>P. aeruginosa</i>
III	Desfan-100 al 0.2%	<i>A. lwoffii</i>
IV	Cloruro de benzalconio al 0.2%	<i>C. albicans</i> <i>A. brasiliensis</i>

Se desafió 99mL de cada solución sanitizante, durante 30 segundos mediante agitación residual con 1mL de suspensión microbiana a una concentración conocida de UFC/mL determinada previamente.

Posterior a los 30 segundos de contacto se tomó 1mL de la mezcla y se transfirió a un tubo con 9mL de solución neutralizante para inhibir la acción del sanitizante.

En la Figura 2.4 se ilustra el Método general para desafío de sanitizantes.

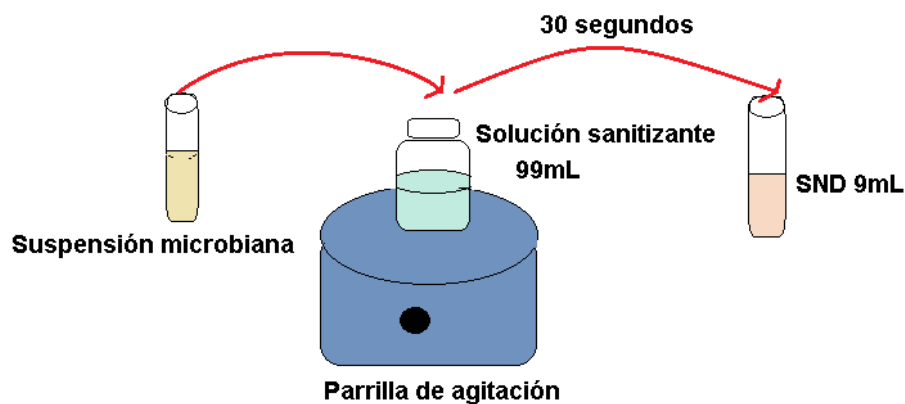


Imagen 2.4 Método general desafío de sanitizantes

2.5 Determinación de UFC/mL sobrevivientes y porcentaje de reducción.

Una vez neutralizada la acción sanitizante, se determinó el número de UFC/mL sobrevivientes de los microorganismos en la mezcla partiendo de alícuotas de 0.1 mL y 1mL por la técnica descrita en la norma mexicana NOM-092-SSA1-1994, ilustrada en la imagen 2.5.

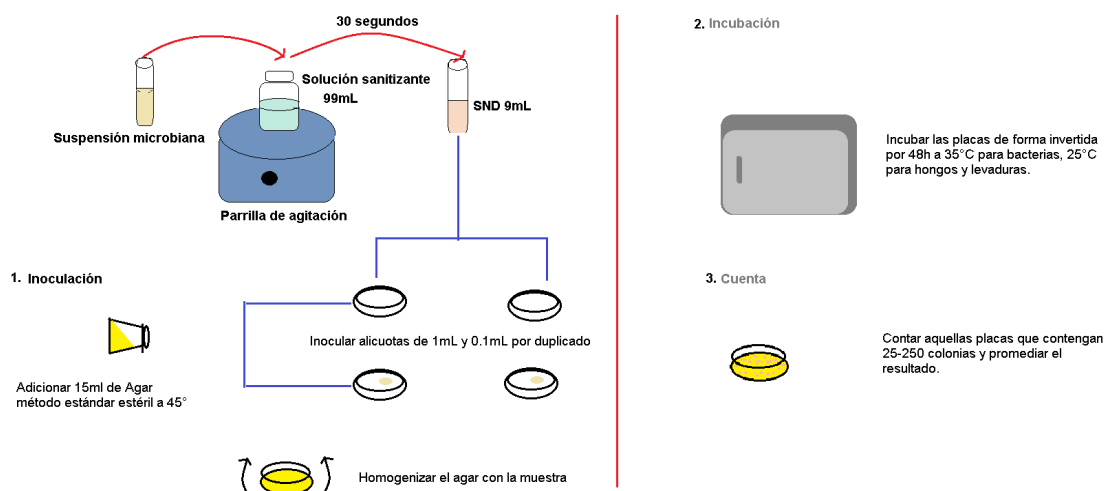


Fig. 2.5 Método general para cuenta de UFC/mL sobrevivientes

Una solución sanitizante para considerarse efectiva debe tener un 99,999 % de reducción en la cuenta viable de en 30 segundos de contacto a la concentración de uso recomendada, cuando la cuenta inicial es de $75-125 \times 10^8$ UFC / mL.

Se calculó el porcentaje de reducción aplicando la Ecuación 4 mediante el número de UFC/mL en la cuenta inicial y la cuenta de sobrevivientes obtenidos de los ensayos realizados a las soluciones sanitizantes frente a cada microorganismo de prueba. En el anexo se muestran los cálculos realizados para calcular %e.

El porcentaje de reducción se calcula mediante la siguiente formula:

Ec. 4

$$\%e = 100 - (s \times 100) / cv$$

Donde:

%e: porcentaje de reducción

cv: cuenta viable inicial, UFC/mL (control)

s: cuenta problema, UFC/mL (sanitizante)

III Resultados y discusión

3.1 Estandarización de suspensiones microbianas

La estandarización del rango de transmitancia equivalente a $75-125 \times 10^8$ UFC/mL se realizó en 10 suspensiones microbianas para cada cepa. Los resultados obtenidos se dividieron en 2 categorías: 1) Estandarización de suspensiones bacterianas, representados en la figura 3.1 y 2) Estandarización de suspensiones para mohos y levaduras, mostrados en la tabla 3.2

Tabla 3.1 Estandarización de suspensiones bacterianas

Microorganismo	%T mínima	UFC/mL	%T máxima	UFC/mL
<i>E. coli</i>	2.3	123×10^8	4.9	82×10^8
<i>S. aureus</i>	2.1	128×10^8	3.7	97×10^8
<i>P. aeruginosa</i>	2.1	146×10^8	3.5	101×10^8
<i>A. lwoffii</i>	2.0	99×10^8	4.6	87×10^8

En la tabla 3.1 podemos observar que para las suspensiones bacterianas existe una relación inversamente proporcional del número de UFC/mL con el porcentaje de transmitancia obtenido, debido a que una suspensión celular aparece turbia a la vista por que las células dispersan la luz que atraviesa, entre más células haya será mayor la turbidez, por tanto menor transmitancia.[32] Para éstas suspensiones se precisó un rango de 2 a 5 % de Transmitancia, ya que por debajo del 2% el número de UFC/mL sobrepasaron el límite establecido en la norma mexicana NMX-BB-040,1999, dificultando de esta manera la cuenta de colonias y por el contrario las suspensiones que tenían un porcentaje de transmitancia mayor al 5% el número de UFC/mL contenidas no era representativa.

Estos valores obtenidos fueron considerados para preparar las suspensiones bacterianas previas a cada ensayo.

Tabla 3.1 Estandarización de suspensiones para mohos y levaduras

Microorganismo	1	2	3	4	5
<i>C.albicans</i>	109x10 ⁸	117x10 ⁸	120x10 ⁸	125x10 ⁸	129x10 ⁸
<i>A.brasiliensis</i>	113x10 ⁷	118x10 ⁷	123x11 ⁷	137x10 ⁷	144x10 ⁷

Para el caso de las suspensiones de *Candida albicans* ATCC 10231 no se logró precisar un rango de porcentaje de transmitancia en el que se obtuviera el número de UFC/mL establecido en la norma mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999, puesto que suspensiones muy concentradas pierden la equivalencia entre el número de células presentes y la luz transmitida. [32]

No se logró concentrar las suspensiones de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 a un número de 75-125 x 10⁸UFC/mL, por ello se tomó a consideración la norma UNE-EN 1725, para establecer un inóculo de prueba con una concentración menor. [27]

3.2 Porcentaje de reducción

Los resultados obtenidos al valorar la actividad sanitizante de cuatro soluciones a la concentración de uso adecuada empleadas en Alvartis Pharma S.A. de C.V frente a 6 cepas diferentes se presenta en términos de % de reducción, en base a lo establecido en la NMX-BB-040-SCFI, 1999. Estos resultados son representados en las gráficas que a continuación se mencionan:

Figura 3.1 Evaluación del porcentaje de reducción de *S. aureus*

Figura 3.2 Evaluación del porcentaje de reducción de *E. coli*

Figura 3.3 Evaluación del porcentaje de reducción de *P.aeruginosa*

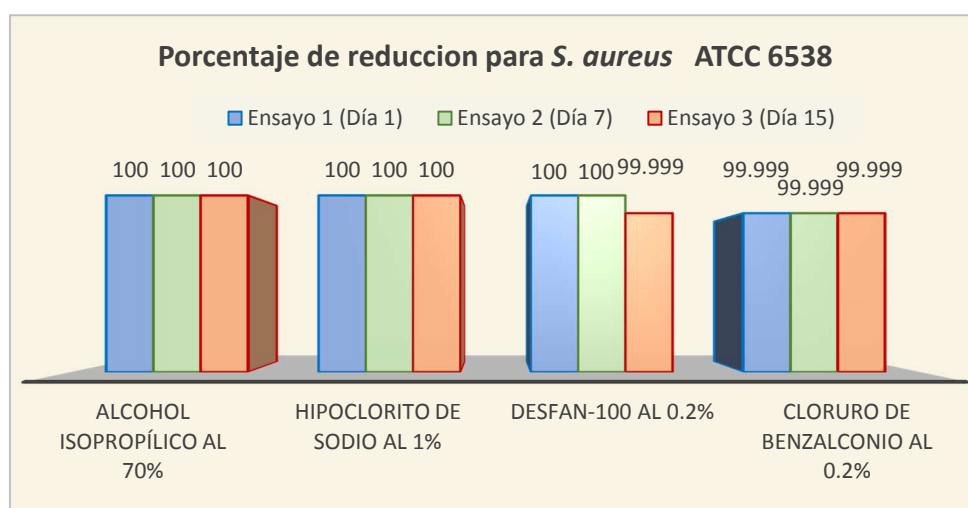
Figura 3.4 Evaluación del porcentaje de reducción de *A. lwoffii*

Figura 3.5 Evaluación del porcentaje de reducción de *C.albicans*

Figura 3.6 Evaluación del porcentaje de reducción de *A. brasiliensi*

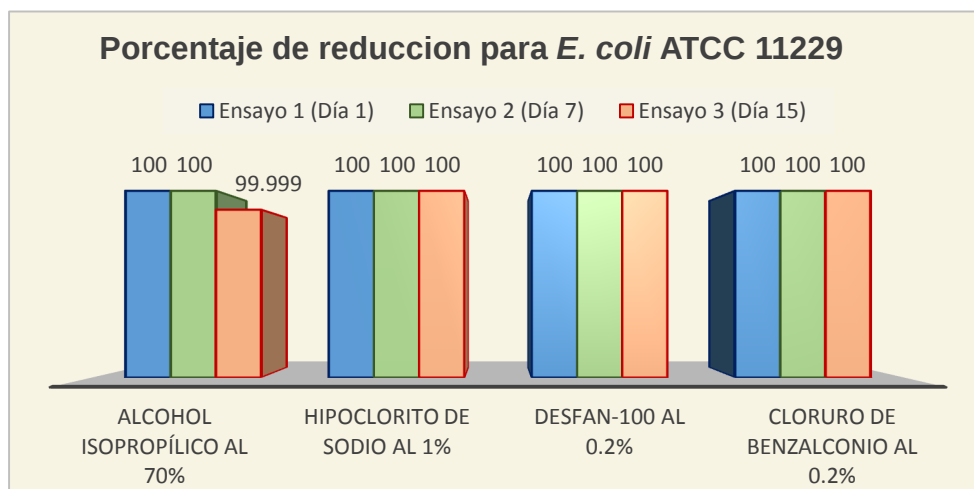
En las siguientes graficas observamos que la actividad sanitizante de los diferentes productos ensayados difiere en función de dos parámetros principales: 1) Tipo de microorganismo al que se enfrenta y 2) El tiempo de vida útil de las soluciones preparadas.

Figura 3.1 Evaluación del porcentaje de reducción de *S. aureus*



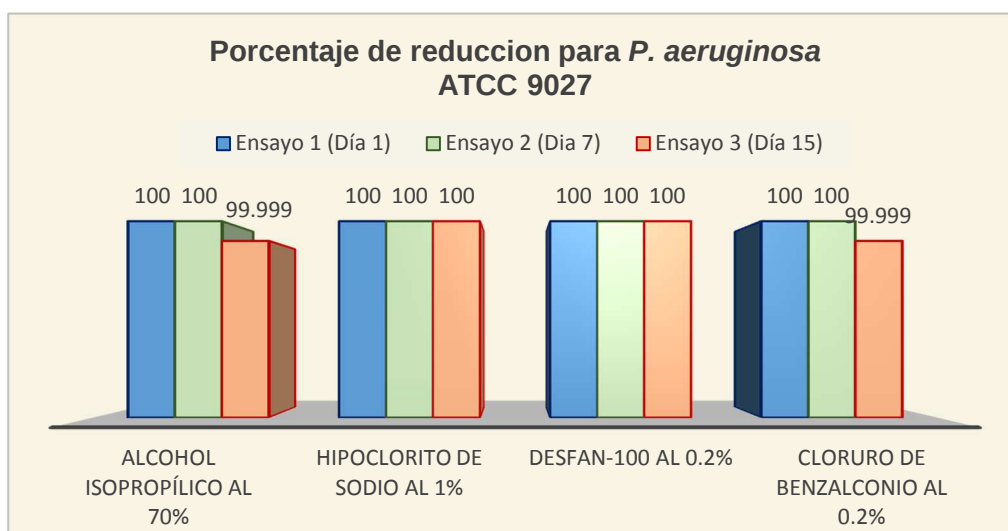
En general las cuatro soluciones sanitizantes en estudio cumplen con el porcentaje mínimo de reducción en la cuenta de *S. aureus*. Observamos que el hipoclorito de sodio y alcohol isopropílico presentan mejor efectividad y no se ven afectadas con el transcurso del tiempo lo que nos indica que es seguro emplear éstas soluciones sanitizantes durante todo su periodo de vida útil estipulado en el PNO-PR-032, por el contrario el Desfan disminuye su actividad en los días finales de vida útil probablemente a una conservación inadecuada de las soluciones, a pesar de ello sigue siendo efectivo. Por último observamos que la efectividad del cloruro de benzalconio es menor en comparación a los anteriores pero ésta se mantiene durante todo el periodo de vida útil, por lo que suponemos que su actividad frente a *S. aureus* es menor ya que ciertas cepas de éste microorganismo presenta resistencias al grupo de compuestos de amonio cuaternario.

Figura_3.2 Evaluación del porcentaje de reducción de *E. coli*



E. coli es una bacteria gramnegativa que presenta susceptibilidad frente a una gran variedad de sanitizantes siempre que éstos se apliquen en las concentraciones y condiciones adecuadas, los resultados presentados en la gráfica 3.2 son reflejo de ello, todas las soluciones de ensayo cumplieron con el porcentaje mínimo de reducción y se mantuvo durante su periodo de vida útil a excepción del alcohol isopropílico que disminuyó su actividad en los días finales probablemente a causa de la evaporación del mismo por un almacenamiento inadecuado.

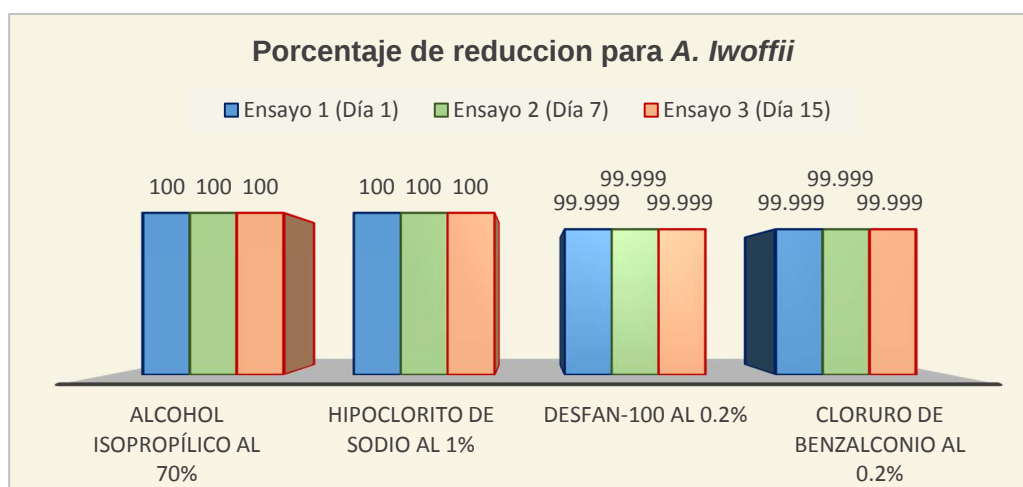
Figura 3.3 Evaluación del porcentaje de reducción de *P. aeruginosa*



Todas las soluciones cumplen con el porcentaje mínimo de reducción para *P. aeruginosa*.

Hipoclorito de sodio y Desfan-100 obtuvieron el mejor desempeño al reducir por completo la cuenta de *S. aureus* y mantener su efectividad durante todo el tiempo de vida útil. En el caso del alcohol isopropílico observamos nuevamente que reduce su actividad en los últimos días de vida útil lo que nos sugiere realizar ensayos más a detalle para reajustar el periodo de vida asignado con el fin que su actividad no se vea afectada por el paso del tiempo. Finalmente observamos que las soluciones de cloruro de benzalconio pierden actividad con el paso del tiempo para la reducción de *P. aeruginosa*, lo cual puede ser a consecuencia de una contaminación del sanitizante por esta cepa ya que se reporta resistencia para éstos casos.1.6

Figura 3.4 Evaluación del porcentaje de reducción de *A. lwoffii*

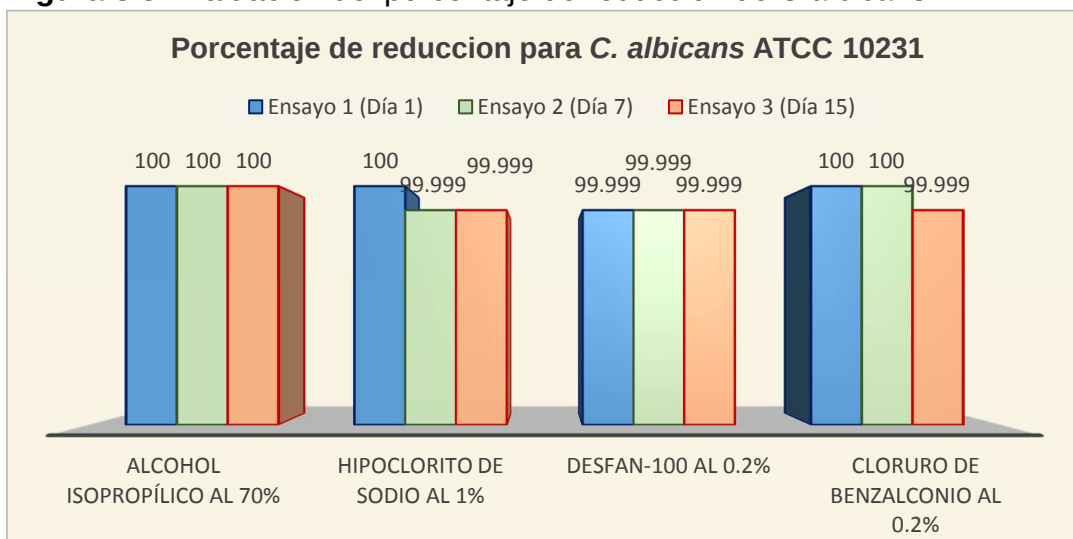


A. lwoffii es una bacteria gramnegativa que se obtuvo del aislamiento de áreas de fabricación en Alvartis Pharma S.A. de C.V., por lo que el medio ambiente en el que se encuentra le confiere propiedades de resistencia frente a los sanitizantes empleados, dicha situación se ve reflejado en las soluciones de Desfan y Cloruro de benzalconio que tienen menor actividad frente a ésta cepa.

En vista que se estaban presentando disminuciones de la actividad del alcohol isopropílico en los últimos días de vida útil, para esta etapa se hizo mayor hincapié en la conservación y almacenamiento de las soluciones preparadas para evitar su evaporación, de esta manera observamos que se logró mantener la efectividad durante todo el periodo de vida.

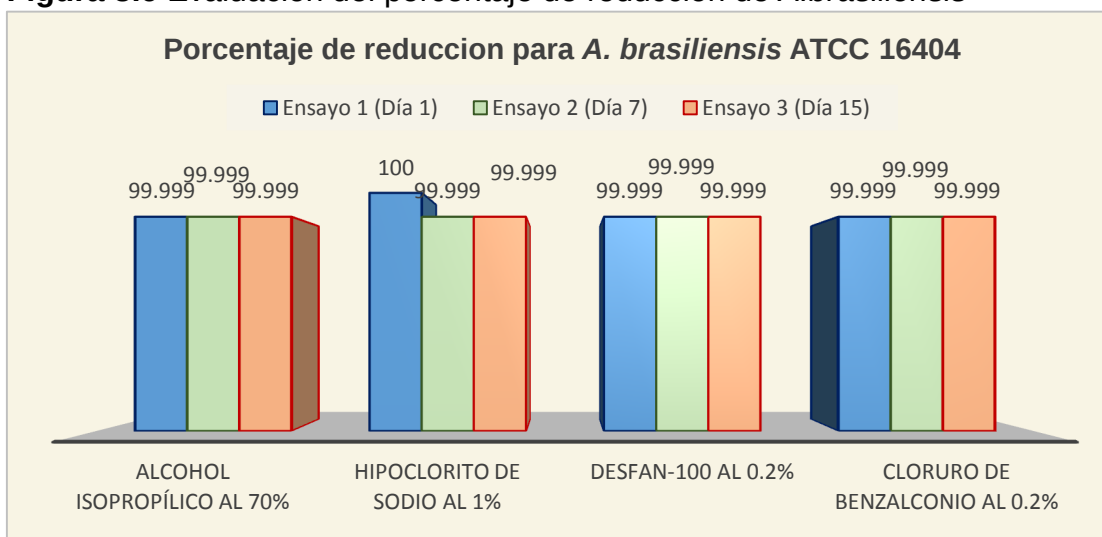
Finalmente tenemos que el mejor desempeño lo obtuvieron las soluciones de hipoclorito y alcohol al conseguir una reducción total en la cuenta de *A. lwoffii* y no se vieron afectadas con el paso del tiempo.

Figura 3.5 Evaluación del porcentaje de reducción de *C. albicans*



La actividad de los sanitizantes frente a *C. albicans* fue muy variable, podemos observar que el mejor desempeño lo presenta el alcohol isopropílico al conseguir una reducción total y mantener su actividad durante todo el periodo de vida útil. En general observamos que la efectividad de los sanitizantes reduce conforme al tiempo frente a esta cepa, por lo que es recomendable de soluciones recién preparadas para el control de estos microorganismos para garantizar una efectividad completa en su erradicación.

Figura 3.6 Evaluación del porcentaje de reducción de *A. brasiliensis*



Podemos observar que *A. brasiliensis* en comparación con los otros microorganismos presenta mayor resistencia a la actividad sanitizantes a pesar que se empleó una concentración menor a la de las suspensiones bacterianas, esta resistencia es dotada por sus esporas altamente resistentes. Aun así todas las soluciones lograron el porcentaje mínimo de reducción en la cuenta de este microorganismo y su actividad no se vio afectada con el tiempo a excepción de hipoclorito de sodio.

IV Conclusiones

- Todos las soluciones sanitizantes cumplen como mínimo con el 99.999% de reducción de las microorganismos.
- En relación al tiempo de vida útil, cuanto más cerca esta su caducidad la efectividad se ve afectada de modo que disminuye.
- Presentan mayor efectividad contra microorganismos bacterianos y menor para hongos y levaduras.
- El periodo de vida útil del alcohol isopropílico resulta ser inadecuado ya que se pierde efectividad con el paso del tiempo.
- Los microorganismos formadores de biofilm muestran mayor resistencia frente a los sanitizantes químicos.

V Bibliografía

- [1] NMX-BB-040-SCFI, 1999. Métodos generales de análisis, determinación de La actividad antimicrobiana en productos Germicidas
- [2] NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.
- [3] NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- [4] Kenneth J. Ryan, MD, C. George Ray, MD, Microbiología médica, McGraw-Hill, Interamericana, 2005, p. 285-295, 373-403, 419-424, 725-734
- [5] Patrick R. Murray, PhD, Microbiología Médica, Elsevier España, 2009, p. 209-222, 301-307, 333-340, 751-773
- [6] Michael E. Aulton, Farmacia, La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas, segunda edición, Elsevier España, 2004, p. 623-668
- [7] Tylor Maria Luisa, Haro Irene, Guía de bacteriología médica, McGraw-Hill, 2007, p. 16-197
- [8] Brooks Geo F., Carroll Karen, 19° edición, Manual Moderno, 2008, 235-242, 261-280, 674-688
- [9] Seymours S. Block, Desinfection, Sanitization, and Preservation, Lippincott Williams, Wilkins, 2011, p. 135, 229, 445, 491
- [10] farmacología básica y clínica, McGraw-Hill, 2010, p. 879-881
- [11] A. del puerto, C. Iglesias, E. Morales, T. Baños, N. Nocedo, M. D. Carnota, G. Martínez, R. (2009). Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. *SCIELO. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1025-028X2009000100004&script=sci_arttext*
- [12] Chinen I, Tanaro JD, Milliwebsky E, Lound LH, Chillemi G, Ledri S, *et al.* Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J Food Prot* 2001; 64: 1346
- [13] Duffy G, Thomas K, Mc Cann M, Murphy M, Lynch MJ, O'Connor, *et al.* Assessing and managing the risk posed by verocytotoxigenic *E. coli* in foods of animal origin. 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) - Producing *Escherichia*

coli Infections 2009. Resumen S11.3, p. 25, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

[14] Galli L, Leotta GA, Gugliada MJ, Rivas M. Análisis in silico de la capacidad de dos técnicas de PCR para la detección del gen *stx*. Rev Argent Microbiol 2008; 40: 9-12.

[15] Jure MA, Castillo M, Aulet O, Micelli S, Sesma F, Ruiz Holgado A, *et al.* Association between hemolytic uremic syndrome and verotoxin-producing strains of *E. coli*. Rev Latinoam Microbiol 1998; 40: 1-8.

[16] Karch H, Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polimerase chain reaction. J Clin Microbiol 1989; 27: 2751-7.

[17] Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1989; 2: 15-38.

[18] Sanitation. Cleaning and Disinfection in the Food Industry. Stanga, M.. WILEY-VCH. 2010.

[19] Cleaning-in-Place: Dairy, Food and Beverage Operations. 3ª edición. Editado por Tamine, A. Y., Blackwell Publinshing. 2008.

[20] Microbial susceptibility and resistance to biocides, A.D. Russel, James R. Furr, Jean-Yves Maillard. .ASM News, nº 63, p. 481-487.1997.

[21] Effects of hospital cleaning agents on spore formation. N American and UK outbreak *Clostridium difficile* strains. S. Underwood, K. Stephenson, W.N. Fawley, J. Freeman, S.D. Baines, R.C. Jr Owens etM.H. Wilcox. The General Infirmary at Leeds & University of Leeds, U.K., Maine Medical Center, Portland, U.S. 2007.

[22] Source: © 2010 Michigan State University and DQS-UL MSS, original at <http://www.fskntraining.org>, licensed using Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported.

[23] To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/> or send a letter to Creative Commons, 559 Nathan Abbott Way, Stanford, California 94305, USA.

[24] ANON. (1990). - Guide to the choice of disinfectants. British Association for Chemical Specialities, Lancaster, United Kingdom, 22 pp.

[25] BLOCK S.S. (ed.) (1991). - Disinfection, sterilization, and preservation, 4th Ed. Lea &

Febiger, Philadelphia & London, 1,162 pp.

[26] DOMAGK G. (1935). - Eine neue Klasse von Desinfektionsmitteln. *Dt. med. Wschr.*, **61**, 829-932.

[27] HASKONING (1994). - Possibilities for future environmental policy on biocides in the European Community. Interim report, June. Haskoning Royal Dutch Consulting Engineers and Architects, Nijmegen, 118 pp.

[28] ISHIKAWA M. & MYOSHI Y. (1980). - Bactericidal effect of several disinfectants against *Mycobacteria tuberculosis* and *Mycobacteria bovis*. *Bokin Bahai*, **8** (4), 145-147.

[29] JACOBS W.A., HEIDELBERGER M. & AMOS H.L. (1916). - The bactericidal properties of the quaternary salts of hexamethylene tetramine. *J. expl Med.*, **23**, 569-599.

[30] KLARMANN E.G. & WRIGHT E.S. (1950). - Are quaternary ammonium compounds sporicidal? *Am. J. Pharm.*, **122**, 330-336.

[31] REBOUL A. (1994). - Active substances database. Association Internationale de la Savonnerie et de la Détergence/Fédération Internationale des Associations de Fabricants de Produits d'Entretien, Brussels, 10 pp.

[32] SPAULDING E.H. (1967). - Recommendations for chemical disinfection of medical and surgical materials. Public Health Service Publication 930 C-15. Department of Health, Education and Welfare, Washington, D.C., Vol. 1, 65-67.