

# UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

CARRERA DE QUIMICA INDUSTRIAL



## EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE AMONIOS CUATERNARIOS DE PRIMERA GENERACIÓN EN VEGETALES Y FRUTAS DESARROLLADA EN LABORATORIOS FARMEDICAL S.R.L

“Trabajo dirigido para la obtención del Grado de Licenciatura en Química Industrial.”

**Modalidad:** Trabajo dirigido (SEGÚN HCU No 472/2021)

**ELABORADO POR:** MAIRA NILSE TICONA PÉREZ

**TUTORA:** Dra. NICOLASA LOURDES VINO NINA

**CO-TUTOR:** Lic. EDWIN RAMOS

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2023**

### **Dedicatoria...**

A mis queridos Padres Marcos y Sonia por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; quienes fueron mi fortaleza y mi inspiración... Los cuales me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis metas y proyectos. Gracias padre y madre por el incentivo, comprensión y apoyo brindado.

Agradecimiento:

Primeramente a Dios, pues anhelo el poder agradecerle porque se que esta dentro de mi corazón y me ha dado paz... Me ha iluminado y guiado día a día, porque sin él no habria podido salir adelante, superando las diferentes etapas de mi vida.

A la Universidad Mayor de San Andrés, a la Facultad Tecnología... a mis estimados docentes de la Carrera Química Industrial por todo el conocimiento compartido con mi persona... A todo el personal de Dirección de carrera por la paciencia y consejos.

Infinitamente agradecida con la empresa FARMEDICAL SRL. por brindarme su apoyo incondicional y abrirme sus puertas.

Un agradecimiento especial a mis tutores: Dra. Nicolasa Lourdes Vino y Dr. Edwin Ramos; por su predisposición y colaboración para la elaboración de este trabajo... Estimados doctores este mensaje de agradecimiento va dedicado para ustedes muchas gracias por ser esa cálidad de profesionales.

Para finalizar tambien agradezco a mis compañeros de clase y amigos del trabajo ya que gracias al compañerismo, amistad y apoyo moral han aportado mis ganas de salir adelante en mi carrera profesional.



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL



## INDICE

INTRODUCCIÓN .....	8
I. ANTECEDENTES .....	10
II. JUSTIFICACION .....	10
III. OBJETIVOS .....	11
3.1. Objetivo general .....	11
3.2. Objetivos específicos .....	11
IV. MARCO TEORICO – CONCEPTUAL.....	11
4.1 Amonios cuaternarios.....	11
4.2 Características de los amonios cuaternarios .....	14
4.3 Biguanidas poliméricas (PHMB) .....	16
4.4 Características y propiedades de un desinfectante ideal .....	16
4.5 Factores que afectan la potencia de estos desinfectantes.....	17
4.5.1 Concentración del agente y tiempo de exposición.....	18
4.5.2 pH .....	18
4.5.3 Temperatura .....	19
4.5.4 Naturaleza del microorganismo y otros factores asociados a la población microbiana. ....	19
V. PROCESO METODOLOGICO .....	20
5.1. Metodología a emplear.....	20
5.1.1 Inspección Global.....	20
5.1.2 Población muestral.....	21



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE TECNOLOGÍA**  
**CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL**



5.1.3 Datos de la empresa .....	22
5.2. Recursos humanos .....	22
5.3. Recursos Infraestructura .....	22
5.4. Recursos materiales y equipos.....	23
5.5 Recursos cepas ATCC.....	24
5.6 Recursos Reactivos .....	24
5.7 Recursos económicos .....	25
5.8 Procedimiento de evaluación .....	25
5.8.1 Muestreo .....	25
5.8.2 Método 1: Recuento en Placa .....	25
5.8.3 Método de extensión en superficie .....	26
5.9 Procesamiento de la variable en estudio .....	26
5.9.1 Determinación de la Eficiencia Germicida Porcentual .....	26
5.9.2 Numero de microorganismos iniciales.....	27
5.9.3 Número de microorganismos sobrevivientes a tiempo t. ....	27
5.10. Identificación Microbiológica.....	27
5.11 Método 2: Eficacia Antimicrobiana – Método del antibiograma Disco - placa	28
5.11.1 Determinación de Eficacia antimicrobiana para tres microorganismos diferentes (cepas ATCC) a las mismas concentraciones – 400 ppm.....	29
6 CRONOGRAMA.....	30
7 MARCO DE RESULTADOS, DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS	
32	
7.1 Características fisicoquímicas de los desinfectantes.....	32



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE TECNOLOGÍA**  
**CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL**



7.1 Datos y resultados de efecto bactericida en vegetales – Eficiencia bactericida porcentual .....	33
7.2 Identificación Microbiológica – Vegetales .....	37
7.2.1 Limite microbiológico - DG-6 .....	38
7.2.2 Limite microbiológico - BIOSEP .....	38
7.2.1 Limite microbiológico - GERMEX .....	39
7.3 Datos y resultados de efecto bactericida en Frutas – Eficiencia bactericida porcentual .....	40
7.4 Identificación Microbiológica – Frutas.....	44
7.4.1 Limite microbiológico - DG-6 .....	45
7.4.2 Limite microbiológico - BIOSEP .....	45
7.4.3 Limite microbiológico - GERMEX .....	46
7.5 Eficacia Antimicrobiana – Método del antibiograma Disco – placa .....	46
7.5.1 Eficacia Antimicrobiana - Germex .....	47
7.5.2 Eficacia Antimicrobiana – Biosep .....	48
7.5.3 Eficacia Antimicrobiana – DG-6.....	48
8 CONCLUSIONES.....	51
9 RECOMENDACIONES .....	52
10 BIBLIOGRAFIA .....	54
11 ANEXOS .....	55



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL**



## **RESUMEN**

El presente proyecto de trabajo dirigido es un estudio descriptivo y transversal de investigación elaborado por mi persona, en la empresa Farmedical S.R.L, como parte de mi practica pre profesional, describe el desarrollo de una serie de pruebas y ensayos microbiológicos para la evaluación del efecto antimicrobiano de un desinfectante de verduras y frutas que posee como principio activo amonios cuaternarios de primera generación: Cloruro de Alkil-Dimetil Bencil Amonio Hidrocloruro de Poly-Hexametilen Biguanida y Piridinio Cloruro.

La importancia de este estudio es comprender las características de los productos para establecer, implementar y mantener un conjunto de procesos que provea a este los atributos de calidad apropiados para cumplir con los requerimientos óptimos de calidad deseado, y así también establecer una mejora continua en todos los aspectos en relación a los requerimientos de investigación y desarrollo.

Se trabajó con tres desinfectantes, los cuales se enfrentaron entre sí, en condiciones normales de trabajo: las pruebas de ensayo se realizaron en uso e in vitro con la finalidad de desafiar su capacidad bactericida en vegetales y frutas.

Al determinar la eficacia antimicrobiana mediante el método de antibiograma en disco en tres tipos de microorganismos diferentes: *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* (cepas ATCC), prueba que permitió realizar una comparación cuantitativa según la media aritmética del diámetro de halo de inhibición, la cual permitió determinar la eficacia porcentual entre estas. Logrando así evaluar la potencia de los desinfectantes, se observa en términos generales que los tres cumplen con las especificaciones de aceptación, es así que los resultados obtenidos nos dan los lineamientos para poder seguir desarrollando y evaluando la potencia bactericida de los diferentes amonios cuaternarios de primera generación.



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL**



## **INTRODUCCIÓN**

El presente documento constituye un plan de trabajo el cual permitirá establecer un instrumento de planificación entendiendo por este como un proceso de concertación que, por su carácter dinámico, evoluciona y se adecua a un contexto experimental y temporal.

Las frutas y verduras son componentes esenciales de la dieta humana y hay evidencia considerable de los beneficios de salud y nutricionales asociados con su consumo (Warriner et al., 2005; Abadías et al., 2008).

Sin embargo, diversos microorganismos patógenos son frecuentemente vinculados con frutas y vegetales que se consumen crudos. Se destacan *Salmonella* spp, y *Escherichia coli*, entre otros (Gómez- Álvarez et al., 2012). Por lo tanto, el saneamiento de estos alimentos después de su cosecha y antes de su consumo es una práctica importante que puede disminuir hasta en un 50% o más pérdidas por su descomposición debidas a los ataques por los microorganismos (Sargent et al., 2000). Esto ocurre principalmente por la desinfección del agua de lavado y superficie de estos alimentos.

En la industria alimentaria la preparación de los alimentos conlleva seguir un proceso de elaboración rigurosamente estricto, el mismo que se debe encontrar libre de todo tipo de contaminación física, química y microbiana es por eso que las empresas destinadas a estas actividades optan por la implementación de sistemas que ayuden a promover la inocuidad y seguridad alimentaria. (Crespo, 2009, pp 17-18).

La presencia de microorganismos se considera uno de los mayores problemas que tiene que enfrentar toda industria y más aún la de alimentos por esta razón la importancia de adoptar métodos y ensayos de eliminación y prevención de la





**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL**



contaminación, teniendo como único objetivo la calidad del producto para garantizar la salud de quien lo consuma.

El validar un desinfectante es verificar su acción frente a los microorganismos, es comprobar su efectividad y mantener el producto libre de patógenos siendo clave para la confiabilidad de los mismos, las empresas asegurarán un mayor porcentaje de rentabilidad al ofrecer productos de calidad creando posibilidades de expandir el mercado de sus productos. (Acosta, I; Valley, M, 2011)

La validación de desinfectantes va a permitir identificar el poder de eliminación de los microorganismos, va a proporcionar un mayor nivel de confianza y saber que si el mismo está cumpliendo con su objetivo es decir si ésta siendo efectivo a un tiempo y concentración dado por el proveedor. Mediante este estudio se va a permitir sustentar una clara documentación como registros de interés para la industria. Considerando la importancia de los productos de desinfección dentro de la industria alimentaria, este trabajo tuvo como principal interés el evaluar o verificar la efectividad de un nuevo desinfectante “Germex” producto en desarrollo de la empresa farmacéutica Farmedical S.R.L cuyo producto, tiene como finalidad ser empleado en el proceso de lavado y desinfección de vegetales y frutas.

La verificación se realizará en base a la actividad antimicrobiana de desinfectantes de amonio cuaternario de primera generación; Cloruro de Alkil-Dimetil Benzil Amonio y un desinfectante a base Piridonio Cloruro, a través de las técnicas de, Recuento microbiano y Eficacia Antimicrobiana, verificaciones microbiológicas que se realizaran en las áreas de análisis y proceso del área de Microbiología.

Se pretende presentar una evidencia documentada que le proporcionara a Laboratorios Farmedical, evolucionar la fórmula o determinar la posología y forma de administración de este desinfectante de verduras y frutas.



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL**



## **I. ANTECEDENTES**

Internacionalmente instituciones como la OMS (organización mundial de la salud), OPS (Organización Panamericana de la Salud), USAID (Agencia de Estados Unidos para el Desarrollo Internacional) publican trabajos que sirven de guía para una adecuada inocuidad alimentaria incluyen, publicaciones como Validación del proceso de desinfección que muestran cómo se debe seguir este proceso comprendiendo la puesta en marcha, la verificación o monitoreo del proceso y las cualidades técnicas. (Acosta, I; Valley, M, 2011)

Con este estudio se permitirá ofrecer un producto de calidad que evite las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAS) que garantice calidad, seguridad y confianza al momento de emplear un producto que tiene como finalidad la desinfección de vegetales y frutas.

## **II. JUSTIFICACION**

Es necesario garantizar la calidad, confianza y seguridad de la eficacia antimicrobiana del desinfectante de frutas y vegetales Germex, para verificar o mejorar la calidad del producto, siendo de esta manera los consumidores los más beneficiados porque obtendrán un producto de alta calidad acorde a sus exigencias y necesidades. Es por eso que este estudio se lo realizara en el departamento de control de calidad microbiológico del Laboratorio FARMEDICAL S.R.L.



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL**



### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto anti microbiano en uso e in-vitro de desinfectantes compuestos por amonios cuaternarios de primera generación en Laboratorios Farmedical S.R.L., con la finalidad de desafiar su capacidad bactericida en vegetales y frutas.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Comparar la efectividad antimicrobiana de tres tipos de desinfectantes de vegetales y frutas, compuestos por amonios cuaternarios de primera generación.
- Determinar la actividad antimicrobiana del producto Germex desafiado su capacidad bactericida frente a otros que están dentro del mercado.
- Aplicar conocimientos en manejo de cepas ATCC para determinar el grado de eficacia antimicrobiana y recuento en placa en vegetales y frutas.
- Examinar la posología o forma de administración del desinfectante de verduras y frutas Germex.
- Contribuir en el desarrollo de la forma farmacéutica acuosa Germex, para garantizar la calidad de este producto.

### **IV. MARCO TEORICO – CONCEPTUAL**

#### **4.1 Amonios cuaternarios**

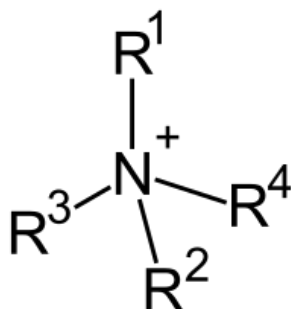
Los amonios cuaternarios son compuestos químicos clasificados dentro del grupo de los tensoactivos catiónicos. Su estructura general comprende una porción



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL



catiónica compuesta por un átomo de nitrógeno unido a cuatro cadenas alquílicas (parte funcional de la molécula) y un átomo halógeno (generalmente cloro).



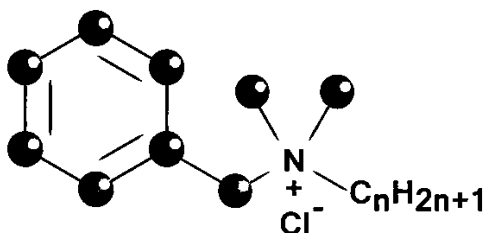
Fuente: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada. «quaternary ammonium compounds». *Compendium of Chemical Terminology*. Versión en línea (en inglés)

Son conocidos como QACs y son las sales de amonio (NH<sub>4</sub>) sustituidos por grupos arilo o alquilo, son tensioactivos. Las sustancias de amonio cuaternario con más frecuencia utilizadas son el bromuro de cetiltrimetilamonio y cloruro de laurildimetilbelzilamonio. Tienen gran efectividad sobre GRAM positivas siendo las esporas altamente resistentes a estas sustancias, aunque previenen su aparición, las zonas que han sido desinfectadas por amonios cuaternarios presentan una cubierta bacteriostática que va a evitar el desarrollo de las bacterias residuales, su actividad es efectiva a pH mayor a 5, una desventaja es que el agua va a disminuir su actividad. A diferencia de los compuestos clorados estos no se ven afectados por la materia orgánica, no son agentes corrosivos y además no producen irritación en piel, tiene propiedades detergentes adicionales. No tienen compatibilidad con jabones o con detergentes que sean aniónicos. (INSHT, 1999).

Fueron desarrollados en 1916 por Jacobs y Heidelberg que ya destacaron sus propiedades biocidas, y mejorados en 1935 por Domagk, quien propuso que la



unión de un grupo alifático al nitrógeno cuaternario mejoraba las propiedades biocidas del compuesto. Domagk desarrolló el cloruro de alquil dimetil bencil amonio (ADBAC por sus siglas en inglés) que es considerado como el amonio cuaternario de **primera generación**.



### Benzalkonium chloride

Fuente: Cloruro de benzalconio, 123RF.

Posteriormente, la sustitución de un hidrógeno en el anillo alifático por un grupo etilo, dio origen a la **segunda generación** de amonios cuaternarios. Conocidos como ADEBAC, cloruro de alquil dimetil etilbencil amonio.

En el año 1955 se creó la **tercera generación** de amonios cuaternarios con la combinación de ADBAC y ADEBAC que proporcionaba mejoras en su actividad biocida y detergencia a la par que disminuía su toxicidad.

Mejoras técnicas en la síntesis química permitieron que, en el año 1965, se desarrollara la **cuarta generación** de amonios cuaternarios. Se trata del cloruro de alquil dimetil amonio (DDAC) y se caracteriza por una mayor eficacia biocida respecto a las generaciones anteriores, especialmente evidente en condiciones de presencia de suciedad orgánica y/o aguas duras.



La **quinta generación** de amonios cuaternarios la comprenden mezclas en distintas proporciones de DDAC y ADBAC para obtener un amplio rango de actuación frente a la máxima cantidad de microorganismos.

Generación	Compuesto(s)
PRIMERA	ADBAC
SEGUNDA	ADEBAC
TERCERA	ADBAC + ADEBAC
CUARTA	DDAC
QUINTA	DDAC + ADBAC

Fuente: Evolución y características de los amonios cuaternarios para desinfección de superficies; Proquimia, D. Calvente

#### 4.2 Características de los amonios cuaternarios

Su naturaleza neutra y su relativa inocuidad hacen de los amonios cuaternarios un compuesto ideal para la desinfección de superficies y ambientes. Entre sus principales ventajas encontramos:

- Amplio espectro bactericida, fungicida y virucida. Su mecanismo de actuación, penetrando y rompiendo la membrana citoplasmática, degradando proteínas y ácidos nucleicos y, finalmente, provocando la lisis celular, le confiere excelentes propiedades frente a todo tipo de microorganismos.
- Baja corrosividad. No atacan la mayoría de superficies presentes a nivel industrial e institucional y su manipulación es relativamente



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL



segura comparada con la de otros principios desinfectantes, siempre usando las medidas de protección pertinentes.

- Efectividad incluso en presencia de materia orgánica, especialmente en el caso de las últimas generaciones de amonios cuaternarios.
- Poder residual. Sus características físico-químicas hacen que, en caso de no ser aclarados, se mantengan sobre las superficies y conserven durante tiempo su eficacia desinfectante.

Algunos de los inconvenientes que pueden tener son los siguientes:

- Incompatibilidad con tensioactivos aniónicos que dificulta su formulación conjunta con algunos detergentes.
- Baja efectividad frente a microorganismos formadores de esporas siendo considerados compuestos esporostáticos más que esporocidas. La pared de los esporulados cuando están en forma vegetativa es poco permeable a los compuestos cuaternarios lo que dificulta su mecanismo de acción.
- Dificultad de aplicación en procesos que utilicen bombas y sistemas de recirculación, por su tendencia a formar espuma.
- Su sustentividad en superficies dificulta su aclarado respecto a otros desinfectantes. La normativa vigente obliga a aclarar las superficies que vayan a entrar en contacto con los alimentos para garantizar que no quedan restos de productos químicos desinfectantes que puedan contaminar al alimento:
  - **Según establece la normativa FDA** (Food Code 2009: Chapter 7. Poisonous or Toxic Materials – subpart 204.11 ) los productos sanitizantes y otros desinfectantes químicos aplicados a las superficies en contacto con alimentos, deben



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL**



cumplir los requisitos especificados en la normativa CFR (40 CFR 180.940 Tolerance exemptions for active and inert ingredients for use antimicrobial formulations – food-contact surface sanitizing solutions -). Los amonios cuaternarios están incluidos en esta lista, sin necesidad de aclarado, pero garantizando un drenaje adecuado, en concentraciones máximas que oscilan entre las 200 y 400 ppm según los compuestos cuaternarios utilizados.

- Posibilidad de causar fenómenos de resistencia. Aunque no es común, un uso incorrecto o un trabajo a concentraciones sub-letales puede provocar la aparición de microorganismos tolerantes que obliguen a aumentar la dosis y/o combinar distintos tipos de biocidas.

#### **4.3 Biguanidas poliméricas (PHMB)**

Las biguanidas son principios activos que poseen un amplio espectro de actividad y son muy efectivas frente a *Pseudomonas* spp, por ello se recomienda su uso, especialmente, para industrias de envasado de agua. El mecanismo de acción de PHMB ha sido descrito en numerosos artículos. Se ha demostrado que su máxima actividad biocida se produce a pH entre 5-6, e inicialmente el biocida interacciona con la superficie de la bacteria, y es transferido a la membrana citoplasmática y el citoplasma, donde reacciona con los fosfolípidos, provocando un aumento de la permeabilidad, con liberación de lipopolisacáridos, iones potasio y causa la muerte de la célula.

#### **4.4 Características y propiedades de un desinfectante ideal**

Un desinfectante ideal reúne las siguientes características:





**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL**



Amplio espectro: inactiva bacterias (Gram. positivas, Gram. negativas, micobacterias), virus, hongos, esporas.

- Elevada potencia microbicida
- Acción rápida y sostenida
- No inactivado por materia orgánica
- Compatible con detergentes
- Estable a la concentración y dilución recomendadas
- No tóxico
- No potencial alergénico
- No corrosivo (compatible con cualquier material)
- Fácil de preparar y de usar
- Inodoro o de olor agradable
- Tensión superficial baja
- Con efecto residual
- Económico (buena relación coste/eficacia)
- No dañino para el medio ambiente

No existe en el mercado un desinfectante que cumpla todas estas características. Se escoge uno u otro en función del tipo de microorganismos que queremos eliminar, del material sobre el que se apliquen, la temperatura y el pH de trabajo, el tiempo de actuación, la presencia de materia orgánica sobre el material a desinfectar, etc.

#### **4.5 Factores que afectan la potencia de estos desinfectantes**

La acción de desinfectantes depende de varios factores, entre ellos:

- La concentración del agente químico y tiempo de exposición.



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL**



- pH
- La temperatura.
- Naturaleza del microorganismo y otros factores asociados a la población microbiana.
- La clase de microorganismos presente.
- El número de microorganismos presentes.

El mejor resultado se obtiene cuando el número inicial de microorganismos es bajo y la superficie a ser desinfectada es limpia y libre de sustancias que interfieran.

#### **4.5.1 Concentración del agente y tiempo de exposición**

Existe una estrecha correlación entre la concentración del agente y el tiempo necesario para matar una determinada fracción de la población bacteriana. Si se modifica la concentración se provocan cambios en el tiempo para lograr un mismo efecto. Un ejemplo es con los fenoles: un pequeño cambio en la concentración provoca cambios muy acentuados en el tiempo para lograr un mismo efecto, así, si reducimos la concentración de fenol desde un valor dado a la mitad, necesitamos emplear 64 veces más tiempo para conseguir matar una misma proporción de bacterias. Refiriéndonos al tiempo, no todas las bacterias mueren simultáneamente, ni siquiera cuando se aplica un exceso del agente.

#### **4.5.2 pH**

Afecta tanto la carga superficial neta de la bacteria como el grado de ionización del agente. En general, las formas ionizadas de los agentes dissociables pasan mejor a través de las membranas biológicas y por lo tanto son más efectivos. Los agentes aniónicos suelen ser más efectivos a pH ácidos; los agentes catiónicos muestran más eficacia a pH alcalinos.



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL**



### **4.5.3 Temperatura**

Normalmente, al aumentar la temperatura aumenta la potencia de los desinfectantes. Para muchos agentes el aumento en  $10^{\circ}\text{C}$  supone duplicar la tasa de muerte.

### **4.5.4 Naturaleza del microorganismo y otros factores asociados a la población microbiana.**

Según la especie, fase de cultivo, presencia de cápsula o de esporas y número de microorganismos se afecta la potencia. El bacilo tuberculoso suele resistir a los hipocloritos mejor que otras bacterias. La presencia de cápsula o esporas suelen conferir más resistencia.



## V. PROCESO METODOLOGICO

### 5.1. Metodología a emplear



Figura 1: Pasos a seguir en el proceso de Evaluación antimicrobiana

Realizado por: Maira Ticona Pérez

#### 5.1.1 Inspección Global

Se tomará en cuenta aspectos fisicoquímicos de los amonios cuaternarios (población muestral).



### 5.1.2 Población muestral

Desinfectantes de amonio cuaternario de primera generación Germex; Biosep y DG-6 en la desinfección de vegetales y frutas.

N°	DESINFECTANTES	COMPOSICIÓN	DILUCIÓN DE USO	PROPÓSITO	PROCEDIMIENTO DE USO
1	GERMEX	Cloruro de Alkil-Dimetil Bencil Amonio... 0.3 g Hidrocloruro de Poly-Hexametilen Biguanida 0.1 g 100 mL Vehículo C.S.P	30 gotas en 1 Litro	Desinfección de verduras y frutas.	Dejar reposar la verdura en la solución por 1 a 2 minutos.
2	BIOSEP	Cloruro de Alkil-Dimetil Bencil Amonio... 0.3 g Hidrocloruro de Poly-Hexametilen Biguanida 0.1 g 100 mL Vehículo C.S.P	30 gotas en 1 Litro	Desinfección de verduras y frutas.	Dejar reposar la verdura en la solución por 1 a 2 minutos.



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL



3	DG-6	Cada 100 mL contienen Piridinio Cloruro 10 g agua destilada c.s	30 gotas en 1 Litro	Desinfección de verduras, legumbres, hortalizas y frutas	Dejar las verduras durante 30 segundos en esta solución, removiéndolas. Dejar escurrir la solución antes del consumo o aderezo
---	------	---	---------------------	--	--

### 5.1.3 Datos de la empresa

Empresa Farmacéutica: Farmedical S.R.L

Ubicación: La Paz, Bolivia.

Dirección: Obrajes, Calle 14. Avenida Hernando Siles.

### 5.2. Recursos humanos

N.º	Recursos humanos necesarios	Actividades de cumplimiento	Número de personal necesario
1.	Tutor Institucional	Supervisión y Seguimiento	1
2.	Analista	Ejecución del análisis, elaboración del Informe y reporte de resultados.	1

### 5.3. Recursos Infraestructura

- Laboratorios de Control de Calidad Farmedical S.A
- Laboratorio de Microbiología Farmedical S.A



#### 5.4. Recursos materiales y equipos

N.º	Recursos materiales y equipos necesarios	Cantidad	Unidades requeridas
1.	Laptop	1	Unidad
2.	Internet	50	Horas
3.	Autoclave	1	Unidad
4.	Estufas de Incubación	2	Horas
5.	Cabina de Bioseguridad	1	Unidad
6.	Micropipetas (10;100;1000) uL	3	Unidad
7.	Incinerador	1	Unidad
8.	Asa bacteriológica	1	Unidad
9.	Agitador Vortex	1	Unidad
10.	Refrigerador	1	Unidad
11.	Hornilla eléctrica	1	Unidad
12.	Tubos de tapa rosca	50	Unidad
13.	Gradillas	4	Unidad
14.	Cronometro	1	Unidad
15.	Pipetas	5	Unidad
16.	Probetas	3	Unidad
17.	Cajas Petri	60	Unidad
18.	Discos antibiograma	1000	Unidad
19.	Pinzas	2	Unidad
20.	Matraces Aforados	10	Unidad
21.	Isopos estériles	100	Unidad
22.	Frutas	3	Unidad



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL



23.	Vegetales	3	Unidad
24.	Balanza eléctrica	1	Unidad
25.	Vernier	1	Unidad
26.	Papel madera	10	Unidad

### 5.5 Recursos cepas ATCC

N.º	Recursos Cepas ATCC	Cantidad
1.	Staphylococcus aureus ATCC 6538	1
2.	Escheria Coli ATCC 8739	1
3.	Candida Albicans ATCC 10231	1

### 5.6 Recursos Reactivos

N.º	Recursos Reactivos	Cantidad	Unidades requeridas
1.	Escala de McFarland	1	Unidad
2.	Agar Soya Tripticasa	40	g/L
3.	Agar Sabouraud Dextrosa	65	g/L
4.	Agua Peptonada Tamponada	25.5	g/L
5.	Agua Purificada Estéril	2000	mL
6.	Agar MacConkey	50	g/L
7.	Agar Manitol Salado	111	g/L
8.	Agar XLD	55	g/L
9.	Agar SS	60	g/L
10.	Caldo Caso	30	g/L





## 5.7 Recursos económicos

Rubro de gasto	Unidad	Precio unitario	Precio total	Financiamiento
Frutas y vegetales	6	20 Bs	120 Bs.	Farmedical S.A
Desinfectantes - DG-6	1	80 Bs.	80 Bs.	Farmedical S.A
- Biosep	1	70 Bs.	70 Bs.	Farmedical S.A
Imprevistos (Material de escritorio)	1	50	50	Farmedical S.A

## 5.8 Procedimiento de evaluación

### 5.8.1 Muestreo

Se realizará un muestreo de una población muestral de vegetales y frutas por el método de hisopado, este se lo realizará sobre los vegetales y las frutas al inicio de un procedimiento de lavado con agua potable, y uno final posterior al lavado con el desinfectante en cuestión, el hisopado se colocará en un diluyente adecuado y se realiza el recuento microbiano con la siembra de una alícuota apropiada en agar soya tripticasa especificado.

### 5.8.2 Método 1: Recuento en Placa

Aplicar la metodología de recuento en placa por duplicado para cada medio y usar el recuento medio del resultado.



**Vertido en placa:** para placas Petri de 9 cm de diámetro, agregar 1 mL de la muestra y de 15 a 20 mL de Agar soya tripticasa, agar sabouraud, manteniendo la temperatura de ambos medios a no más de 45°. Emplear al menos dos placas Petri para cada muestra. (Farmacopea USP 38).

### 5.8.3 Método de extensión en superficie

Agregar 15 a 20 mL de Agar Soya Tripticasa o Agar Sabouraud Dextrosa a cada placa Petri de 9 cm de diámetro, aproximadamente a 45° y dejar solidificar. Secar las placas en la cabina de bioseguridad con flujo laminar o en la incubadora. Emplear al menos dos placas Petri para cada medio de cultivo. Esparcir un volumen medido de no menos de 0,1 mL de la muestra. Incubar y realizar el recuento según se indica en método de vertido en placa. (Farmacopea USP 38).

### 5.9 Procesamiento de la variable en estudio

Los datos obtenidos se recopilarán en una hoja de cálculo.

Las variables que se evalúan son: concentración de desinfectante en un mismo tiempo de exposición.

Con los datos ya introducidos, se realizan los gráficos comparativos.

#### 5.9.1 Determinación de la Eficiencia Germicida Porcentual

Determina el porcentaje de bacterias que mueren al contacto con el desinfectante.

Se realiza el cálculo mediante la siguiente formula:

$$\%E = \left( \frac{N_o - N_t}{N_o} \right) * 100$$



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL



Donde:

$N_0$  = Numero de microorganismos iniciales

$N_t$  = Número de microorganismos sobrevivientes a tiempo t.

### 5.9.2 Numero de microorganismos iniciales

$$N_0 = \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias por placa}}{\text{Volumen sembrado} * fd}$$

Donde:

Fd= Factor de dilución

Se realizaron cuatro diluciones seriadas 1/10 por lo que el factor de dilución es de  $10^{-4}$ .

### 5.9.3 Número de microorganismos sobrevivientes a tiempo t.

Consideraciones:

Conteo en placa: Número de UFC

Volumen de siembra: 0.1 mL; El número de UFC/placa son las bacterias que crecieron de un volumen de siembra de 100 uL, entonces necesitamos saber las UFC existentes en un mL de muestra, por lo que calculamos mediante una regla de tres.

### 5.10. Identificación Microbiológica

Por el método de extensión en superficie se procede a la siembra por duplicado de cada muestra de vegetal posterior al procedimiento de desinfección, se utilizan medios de cultivo selectivos.



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL



Agente microbiano	Límite de aceptación por g
<b>Aerobios Mesófilos</b>	$10^6$
<b>Enterobacterias Escherichia Coli</b>	$10^2$
<b>Salmonella sp.</b>	Ausencia/25g
<b>Mohos</b>	$10^2$
<b>Levaduras</b>	$10^2$

Límites de aceptación según norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas RM N° 615- Frutas y Hortalizas frescas y semiprocesadas (lavadas desinfectadas, peladas, cortadas, refrigeradas).

### 5.11 Método 2: Eficacia Antimicrobiana – Método del antibiograma Disco - placa

1. Preparación de las cepas de Trabajo. Repique de cepas 24 hrs.
2. Preparación de las muestras 400 ppm.
3. Preparación de las suspensiones bacterianas ajustadas a la Escala de Mc Farland 0.5.
4. Preparación del agar inoculo y agar base.
5. Proceder a la siembra por triplicado de los discos de antibiograma.
6. Proceder de la misma manera para cada cepa ATCC, Gram positivos, Gram negativos, Hongo Levadura.



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL



7. Incubar por un tiempo de 24 a 18 hrs. A 35°C para bacterias y 25°C para Hongos.
8. Proceder a la lectura de resultados, medición de Halos de inhibición.
9. Analizar los resultados. Reportar los resultados. (Farmacopea USP 38).

**5.11.1 Determinación de Eficacia antimicrobiana para tres microorganismos diferentes (cepas ATCC) a las mismas concentraciones – 400 ppm**

Se realiza el cálculo mediante la siguiente formula:

$$\%EA = \left( \frac{HI_m cm}{HI_E cm} \right) * 100$$

Donde:

$HI_m$  = Promedio diámetros de halo de inhibición - Muestra

$HI_E$  = Promedio diámetros de halo de inhibición - Estándar.



## 6 CRONOGRAMA

### CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

TIEMPO (Mes/semanas)	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES POR MESES																																			
	PRIMER				SEGUNDO				TERCERO				CUARTO				QUINTO				SEXTO				SEPTIMO				OCTAVO							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
Revisión bibliográfica documental	█	█	█	█																																
Establecimiento y validación de idea			█	█																																
Elaboración del plan de trabajo			█	█																																
Evaluación del Plan de trabajo			█	█																																
Sistematización de experiencias			█	█	█	█	█	█	█																											
1er. Informe Trabajo dirigido											█	█	█																							





## 7 MARCO DE RESULTADOS, DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS

### 7.1 Características fisicoquímicas de los desinfectantes.

Tabla: Datos y parámetros fisicoquímicos de los desinfectantes sujetos a evaluación.

CARACTERISTICAS	DESINFECTANTES		
	GERMEX	BIOSEP	DG-6
CONCENTRACION	0.3%;0.1%	0.3%;0,1%	10%
PRINCIPIO ACTIVO	Cloruro de Alkil-Dimetil Bencil Amonio... 0.3 g Hidrocloruro de Poly-Hexametilen Biguanida 0.1 g 100 mL Vehículo C.S.P	Cloruro de Alkil-Dimetil Bencil Amonio... 0.3 g Hidrocloruro de Poly-Hexametilen Biguanida 0.1 g 100 mL Vehículo C.S.P	Cada 100 mL contienen Piridinio Cloruro 10 g agua destilada c.s
Aspecto	Líquida, Homogénea, Translúcida	Líquida, Homogénea, Translúcida	Líquida, Homogénea, Translúcida
Volumen	60 mL	100 mL	60 mL
Color	Incoloro	Incoloro	Incoloro
Peso específico	1.0004	1.0051	1.0012
Partículas extrañas	No presenta	No presenta	No presenta
pH	7.54 a 25°C	7.27 a 25°C	4.90 a 25°C
Biodegradabilidad	Si	Si	Si

Fuente: Ficha Técnica BIOSEP, DG-6/ Elaboración propia.

La tabla nos muestra los datos de los respectivos desinfectantes de acuerdo a sus fichas técnicas, podemos observar que en el caso del Germex y Biosep presentan un pH neutro y el DG-6 un pH ligeramente ácido. Ver figura 1.





### 7.1 Datos y resultados de efecto bactericida en vegetales – Eficiencia bactericida porcentual

Se procedió a realizar el muestreo microbiológico en vegetales, se realizaron cuatro diluciones seriadas 1/10 por lo que el factor de dilución es  $1/10^4$ . Ver Figura 5.

N°	VEGETAL	UFC/Placa	vol de siembra (mL)	factor de dilución	PROCEDIMIENTO DE LAVADO T= 1 minuto								Eficiencia Germicida Porcentual		
					No = CONDICIONES NORMALES DE LAVADO	c.n de lavado PROM (UFC/mL)	Número de microorganismos sobrevivientes a tiempo t = Nt					%E DG6	%E BIOSEP	%E GERMEX	
							DG-6	DG-6 PROM (UFC/mL)	BIOSEP	BIOSEP PROM (UFC/mL)	GERMEX	GERMEX PROM (UFC/mL)			
1	PEREJIL	42	0,1	1,00E-04	4,20E+06	3,80E+06	2480	2385	240	255	360	345	99,9372	99,993	99,991
		34	0,1	1,00E-04	3,40E+06		2290		270		330				
2	LECHUGA	85	0,1	1,00E-04	8,50E+06	8,80E+06	780	830	110	100	310	300	99,9906	99,999	99,997
		91	0,1	1,00E-04	9,10E+06		880		90		290				
3	TOMATE	78	0,1	1,00E-04	7,80E+06	8,60E+06	2670	2760	480	445	570	560	99,9679	99,995	99,993
		94	0,1	1,00E-04	9,40E+06		2850		410		550				
4	BROCOLI	98	0,1	1,00E-04	9,80E+06	9,60E+06	840	880	10	10	380	395	99,9908	100	99,996
		94	0,1	1,00E-04	9,40E+06		920		10		410				

Tabla 7.1: Hoja de Cálculo Excel – Cálculo de Eficiencia Germicida Porcentual - VEGETALES/ Elaboración propia.



En la Tabla 7.1. Se muestran los datos, cálculos y resultados. En la primera columna se muestran los vegetales que se utilizaron para el análisis, estos vegetales se los adquirió de un Mercado popular de la ciudad de La Paz, el Mercado Rodríguez. Ver Figura 2.

Como se explicó previamente en la metodología se realizó el muestreo correspondiente de cada uno de los vegetales logrando recuperar la carga microbiana que posee en su superficie posterior a un lavado en condiciones normales, es decir simplemente con agua, para así determinar el número de microorganismos iniciales, se tomó en cuenta el factor de dilución y la alícuota de siembra 100 uL o 0.1 mL

Por lo que la segunda columna contiene el conteo de unidades formadoras de colonia por placa de una dilución seriada  $10^{-4}$ . La sexta columna nos muestra el número de microorganismos iniciales en condiciones normales de lavado en promedio.

La octava columna muestra en promedio de los microorganismos sobrevivientes en un tiempo de un minuto de contacto con el desinfectante DG-6 en los vegetales, de la misma forma la décima columna muestra el promedio de los microorganismos sobrevivientes del desinfectante Biosep y la doceava del desinfectante Germex. Con estos datos y cálculos previos se procedió al cálculo de la eficiencia germicida porcentual.

Para proporcionar un mejor entendimiento de los cálculos a continuación se detalla un ejemplo tomando la muestra de un vegetal en este caso el perejil.

**Datos:**

DATOS	UFC/placa		Nt (UFC/ml)	
	Agua en c.n	DG-6	BIOSEP	GERMEX
Perejil	42	2480	240	360
	34	2290	270	330
Promedio	38	2385	255	345
Factor de dilución	$1 * 10^{-4}$			
Tiempo	60 segundos = 1 minuto			
Volumen de siembra	100 uL= 0,1 mL			



- **Cálculo del número de microorganismos iniciales**

$$N_o = \frac{UFC}{mL} = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias por placa}}{\text{Volumen sembrado} * fd}$$

$$N_o = \frac{38 UFC}{0.1 mL * 1 * 10^{-4}} = 3.8 * 10^6 UFC/mL$$

- **Cálculo de la Eficiencia Germicida Porcentual DG-6**

$$\%E = \left( \frac{N_o - N_t}{N_o} \right) * 100$$

$$\%E = \left( \frac{3.8 * 10^6 \frac{UFC}{mL} - 2385 \frac{UFC}{mL}}{3.8 * 10^6 \frac{UFC}{mL}} \right) * 100 = 99.9372 \%$$

- **Cálculo de la Eficiencia Germicida Porcentual BIOSEP**

$$\%E = \left( \frac{3.8 * 10^6 \frac{UFC}{mL} - 255 \frac{UFC}{mL}}{3.8 * 10^6 \frac{UFC}{mL}} \right) * 100 = 99.9933 \%$$

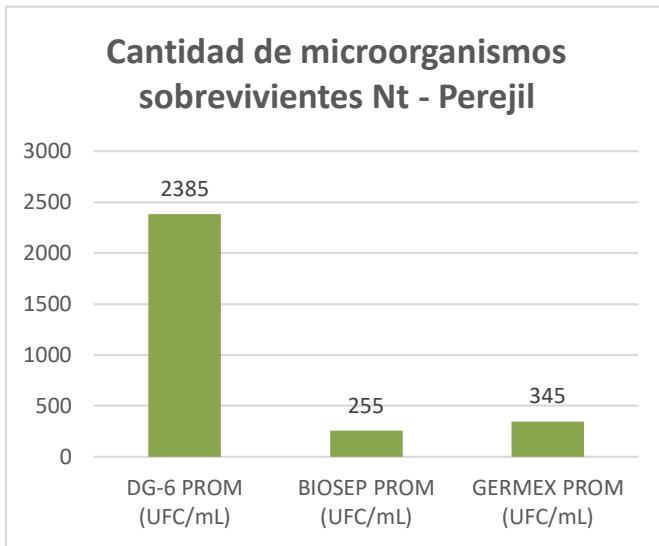
- **Cálculo de la Eficiencia Germicida Porcentual GERMEX**

$$\%E = \left( \frac{3.8 * 10^6 \frac{UFC}{mL} - 345 \frac{UFC}{mL}}{3.8 * 10^6 \frac{UFC}{mL}} \right) * 100 = 99.9909 \%$$



**Grafica 1:** Resultados - Eficiencia Germicida Porcentual de los desinfectantes en estudio DG-6, Biosep, Germex.

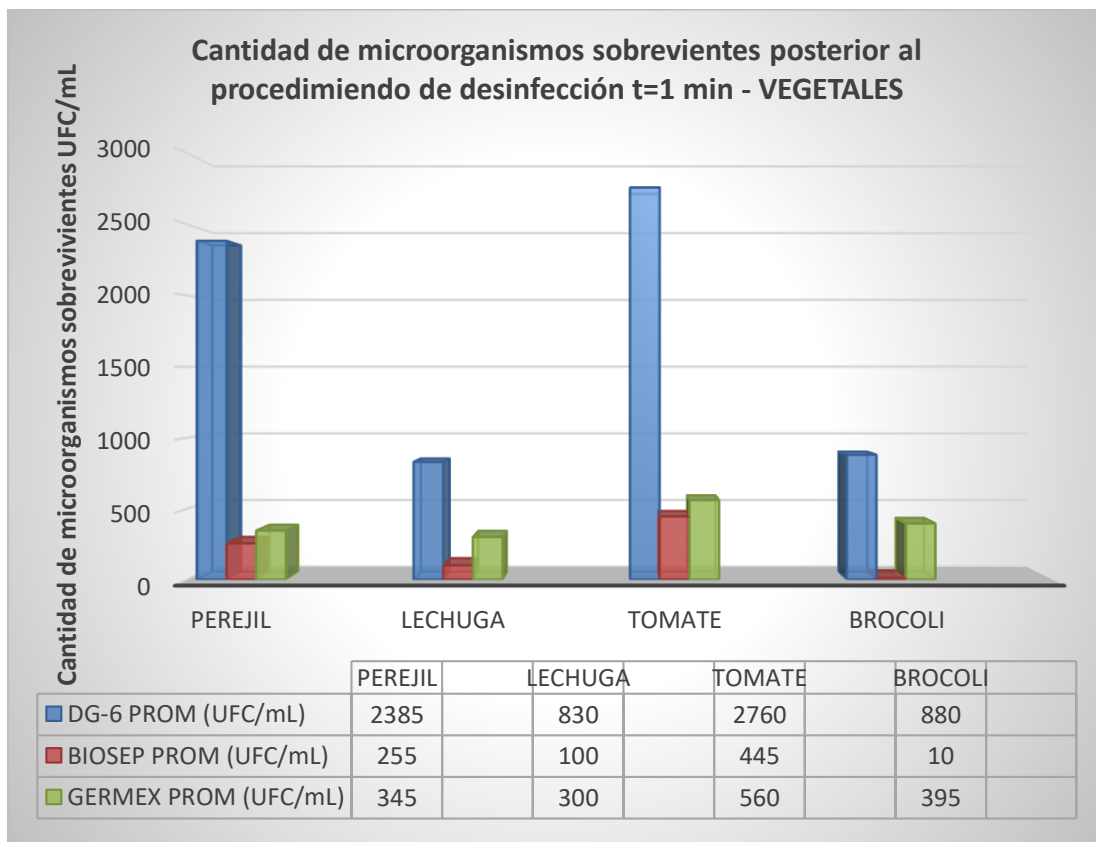
La grafica 1, muestra una comparación de la eficacia germicida porcentual de los tres desinfectantes ya mencionados, se observa un mayor porcentaje de eficiencia germicida en el Biosep y uno menor en el DG-6.



**Grafica 2:** Resultados – Cantidad de microorganismos sobrevivientes posterior al procedimiento de lavado del vegetal (perejil) con los desinfectantes DG-6, Biosep y Germex en un minuto de exposición.

En esta gráfica se observa una comparación de la cantidad de microorganismos sobrevivientes posterior al procedimiento de lavado

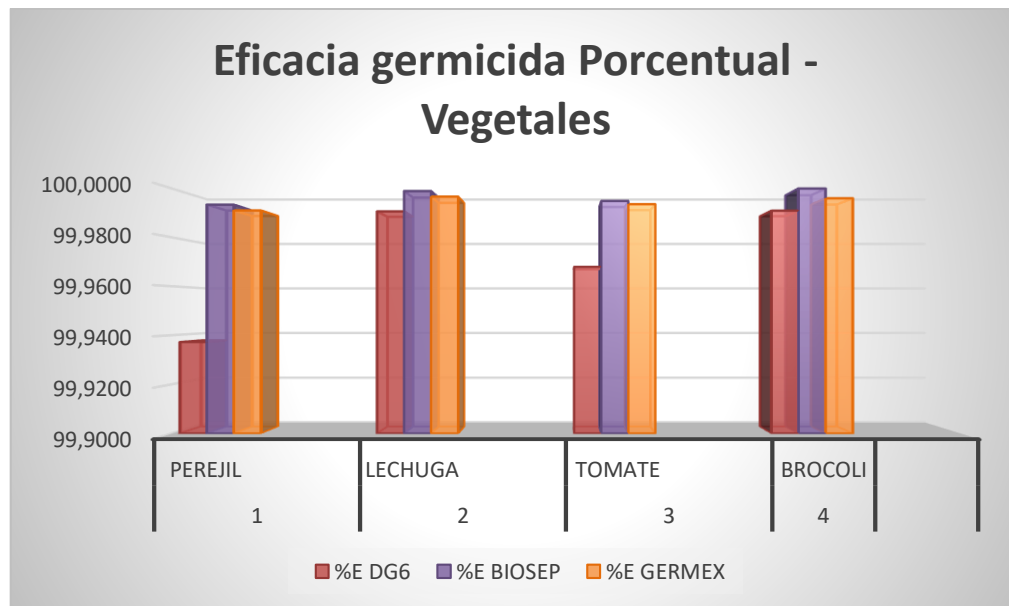
del vegetal (perejil) con los desinfectantes DG-6, Biosep y Germex en un minuto de exposición de los tres desinfectantes ya mencionados, se observa una mayor cantidad de microorganismos sobrevivientes en el desinfectante DG-6 y una menor cantidad en el Biosep.





**Gráfica 3:** Cantidad de microorganismos sobrevivientes en vegetales a tiempo  $t= 1$  minuto, en concentraciones de uso según dilución de uso 30 gotas en un litro.

La cantidad de microorganismos sobrevivientes posterior a un procedimiento de lavado, siguiendo las indicaciones de uso con cada uno de los desinfectantes de verduras DG-6; Biosep y Germex es variable en cada uno de los vegetales, esto se debe a que poseen una carga microbiológica diferente en su superficie.



**Gráfica 4:** Resultados - Eficiencia Germicida Porcentual de los desinfectantes en estudio DG-6, Biosep, Germex. (Vegetales)

La gráfica 4, muestra una comparación de la eficacia germicida porcentual de los tres desinfectantes ya mencionados, se observa un mayor porcentaje de eficiencia germicida en el Biosep en todos los vegetales y uno menor en el DG-6.

## 7.2 Identificación Microbiológica – Vegetales

Las pruebas fueron realizadas por duplicado, los datos fueron organizados y expresados en valores absolutos, utilizando la media aritmética para obtener los valores promedio de cada prueba.



A continuación, se muestran las tablas que muestran los resultados de los respectivos recuentos de mesófilos aerobios, enterobacterias, mohos, levaduras, Salmonella spp., en los diferentes vegetales. Ver figura 7.

### 7.2.1 Limite microbiológico - DG-6

Agente microbiano	Límite de aceptación por g	Microorganismos sobrevivientes – desinfectante DG-6				Dictamen
		Perejil	Lechuga	Tomate	Brócoli	
<b>Aerobios Mesófilos</b>	10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	APROBADO
<b>Enterobacterias Escherichia Coli</b>	10 <sup>2</sup>	Ausencia	10	40	Ausencia	APROBADO
<b>Salmonella sp.</b>	Ausencia/25 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO
<b>Mohos</b>	10 <sup>2</sup>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO
<b>Levaduras</b>	10 <sup>2</sup>	16	9	97	Ausencia	APROBADO

- El desinfectante DG-6 cumple con los criterios de aceptación, en el análisis de límite microbiológico.

### 7.2.2 Limite microbiológico - BIOSEP

Agente microbiano	Límite de aceptación por g	Microorganismos sobrevivientes – desinfectante BIOSEP				Dictamen
		Perejil	Lechuga	Tomate	Brócoli	
<b>Aerobios Mesófilos</b>	10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	APROBADO
<b>Enterobacterias Escherichia Coli</b>	10 <sup>2</sup>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO
<b>Salmonella sp.</b>	Ausencia/25 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO
<b>Mohos</b>	10 <sup>2</sup>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO
<b>Levaduras</b>	10 <sup>2</sup>	6	4	5	Ausencia	APROBADO

- El desinfectante Biosep cumple con los criterios de aceptación, en el análisis de límite microbiológico.



### 7.2.1 Limite microbiológico - GERMEX

Agente microbiano	Límite de aceptación por g	Microorganismos sobrevivientes – desinfectante GERMEX				Dictamen
		Perejil	Lechuga	Tomate	Brócoli	
<b>Aerobios Mesófilos</b>	$10^6$	$< 10^6$	$< 10^6$	$< 10^6$	$< 10^6$	APROBADO
<b>Enterobacterias Escherichia Coli</b>	$10^2$	Ausencia	6	14	Ausencia	APROBADO
<b>Salmonella sp.</b>	Ausencia/25 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO
<b>Mohos</b>	$10^2$	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO
<b>Levaduras</b>	$10^2$	14	7	9	Ausencia	APROBADO

- El desinfectante Germex cumple con los criterios de aceptación, en el análisis de límite microbiológico.



### 7.3 Datos y resultados de efecto bactericida en Frutas – Eficiencia bactericida porcentual

Se procedió a realizar el muestreo microbiológico en frutas, se realizaron tres diluciones seriadas 1/10 por lo que el factor de dilución es 1/10<sup>3</sup>.

N°	FRUTAS	UFC/Placa	vol de siembra (mL)	factor de dilucion	PROCEDIMIENTO DE LAVADO T= 1 minuto							Eficiencia Germicida Porcentual			
					Número de microorganismos iniciales No		Número de microorganismos sobrevivientes a tiempo t = Nt					%E DG6	%E BIOSEP	%E GERMEX	
					No = CONDICIONES NORMALES DE LAVADO	c.n de lavado PROM (UFC/mL)	DG-6	DG-6 PROM (UFC/mL)	BIOSEP	BIOSEP PROM (UFC/mL)	GERMEX				GERMEX PROM (UFC/mL)
1	UVA	15	0,1	1,00E-03	1,50E+05	1,35E+05	490	525	370	355	240	250	99,6111	99,737	99,8148
		12	0,1	1,00E-03	1,20E+05		560		340		260				
2	FRUTILLA	101	0,1	1,00E-03	1,01E+06	9,90E+05	780	830	120	115	161	176,5	99,9162	99,9884	99,9822
		97	0,1	1,00E-03	9,70E+05		880		110		192				
3	DURAZNO	55	0,1	1,00E-03	5,50E+05	5,70E+05	3640	3790	2340	2300	2620	2320	99,3351	99,5965	99,593
		59	0,1	1,00E-03	5,90E+05		3940		2260		2020				
4	CIRUELA	29	0,1	1,00E-03	2,90E+05	2,80E+05	510	514	60	75	300	312	99,8166	99,9732	99,8886
		27	0,1	1,00E-03	2,70E+05		517		90		324				

Tabla 7.3: Hoja de Cálculo Excel – Cálculo de Eficiencia Germicida Porcentual - FRUTAS/ Elaboración propia.





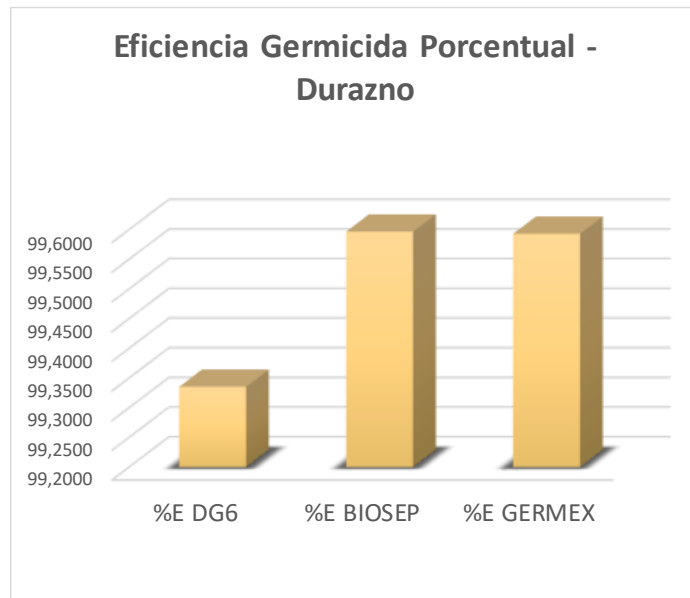
En la Tabla 7.3. Se muestran los datos, cálculos y resultados. En la segunda columna se muestran las frutas que se utilizaron para el análisis, estas también se las adquirió del Mercado Rodríguez ubicado en la ciudad de La Paz.

Se utilizo la misma tabla de cálculos previamente proyectada para el análisis de datos de vegetales, de esta manera así también se utilizó la misma metodología, iniciando por el muestreo por hisopado de las frutas logrando recuperar la carga microbiológica superficial de estas posterior a un procedimiento de lavado en condiciones normales es decir solo con agua de manera de eliminar la materia orgánica superficial, y posteriormente se procedió a seguir con la desinfección de estas frutas utilizando cada uno de los desinfectantes sometiendo las frutas a estos, consideramos el tiempo de un minuto cronometrado y la dilución recomendada según prospecto 30 gotas en un litro, para de esta manera determinar el número de microorganismos iniciales se tomó en cuenta el factor de dilución y la alícuota de siembra 100 uL o 0.1 mL

Por lo que la tercera columna contiene el conteo de unidades formadoras de colonia por placa de una dilución seriada  $10^{-3}$ . La séptima columna nos muestra el número de microorganismos iniciales en condiciones normales de lavado en promedio.

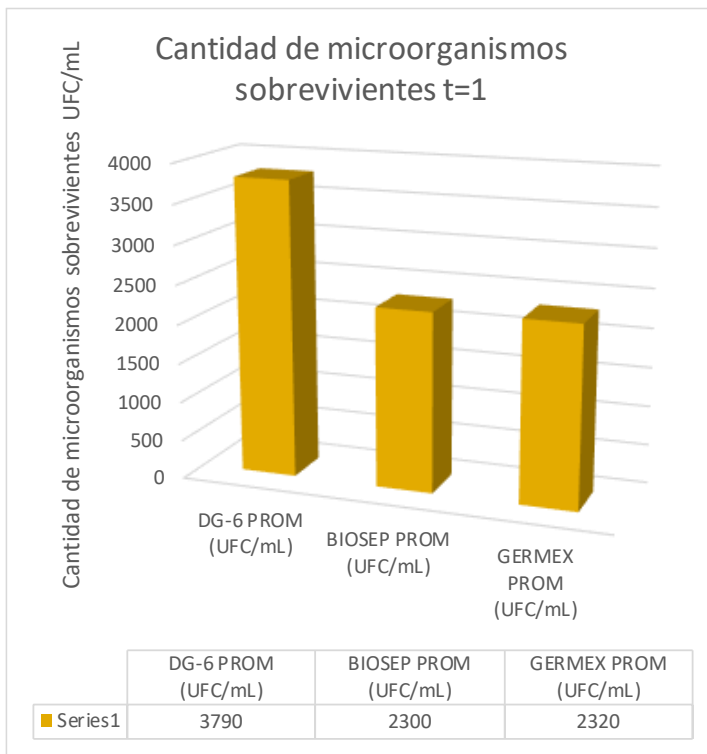
La novena columna muestra en promedio los microorganismos sobrevivientes en un tiempo de un minuto de contacto con el desinfectante DG-6 en frutas, de la misma forma la onceava columna muestra el promedio de los microorganismos sobrevivientes del desinfectante Biosep y la treceava del desinfectante Germex. Con estos datos y cálculos previos se procedió al cálculo de la eficiencia germicida porcentual.

Con los cálculos ya efectuados en la tabla 7.3, se obtuvieron los resultados de eficiencia germicida porcentual, podemos observar que esta efectividad bactericida no difiere de forma importante entre los desinfectantes, pero podemos llegar a la conclusión que la efectividad bactericida es mayor para el Biosep y Germex. En cuanto a su capacidad de eliminación de microorganismos podemos observar que el número de microorganismos sobrevivientes es mayor en el DG-6 y menor en el Biosep y germex. Por lo que podríamos decir que este tipo de amonios cuaternarios es más efectivo que el amonio cuaternario catiónico utilizado en el producto DG-6.



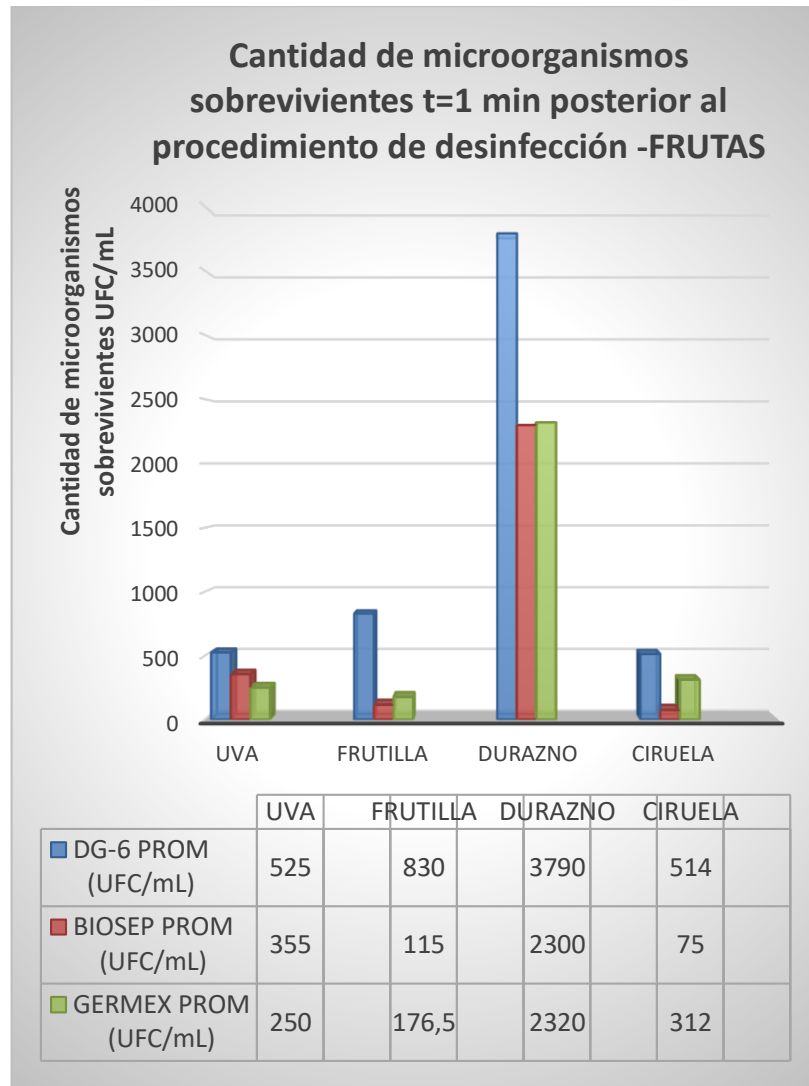
**Grafica 5:** Resultados - Eficiencia Germicida Porcentual de los desinfectantes en estudio DG-6, Biosep, Germex en Frutas - Durazno

La grafica 5, muestra una comparación de la eficacia germicida porcentual de los tres desinfectantes ya mencionados, se observa un mayor porcentaje de eficiencia germicida en Biosep y Germex respecto al DG-6 en la fruta del durazno.



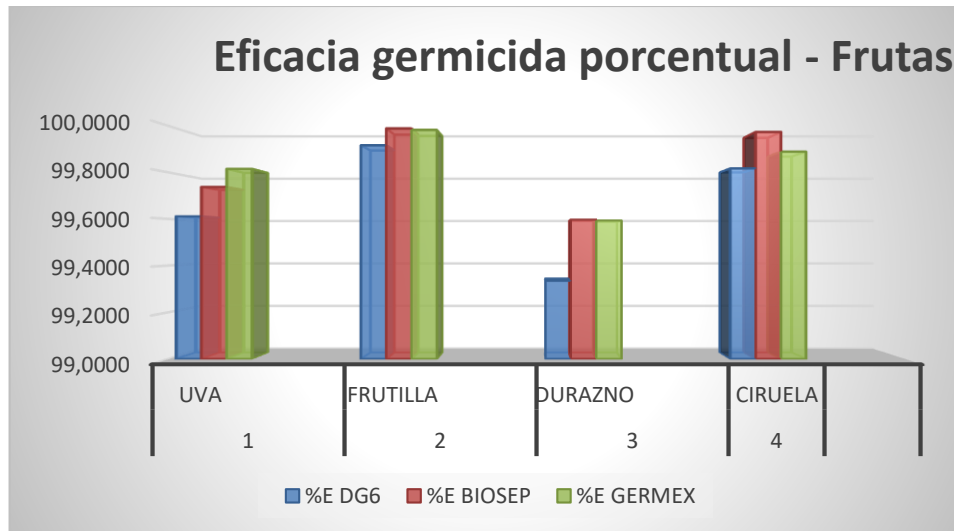
**Grafica 6:** Resultados – Cantidad de microorganismos sobrevivientes posterior al procedimiento de lavado de la fruta (durazno) con los desinfectantes DG-6, Biosep y Germex en un minuto de exposición en concentraciones de uso del desinfectante.

Se observa una mayor cantidad de microorganismos sobrevivientes en el desinfectante DG-6 y una menor cantidad en el Biosep y Germex.



**Gráfica 7:** Cantidad de microorganismos sobrevivientes en frutas, tiempo t= 1 minuto en concentraciones de uso según dilución de uso (30 gotas en un litro). FRUTAS

De la misma forma que en los vegetales, la cantidad de microorganismos sobrevivientes posterior a un procedimiento de lavado en las frutas, es variable en cada una de estas, esto se debe a que poseen una carga microbiológica diferente en su superficie, en la gráfica comparativa se puede observar una mayor cantidad de microorganismos sobrevivientes posterior al procedimiento de desinfección en todas las frutas con el desinfectante DG-6 y una menor en Biosep y Germex.



**Grafica 8:** Resultados - Eficiencia Germicida Porcentual de los desinfectantes en estudio DG-6, Biosep, Germex. (Frutas)

La gráfica 8, muestra una comparación de la eficacia germicida porcentual de los tres desinfectantes ya mencionados en frutas, se observa un mayor porcentaje de eficacia germicida en el Germex y Biosep en todas las frutas y uno menor en el DG-6.

#### 7.4 Identificación Microbiológica – Frutas

Las pruebas fueron realizadas por duplicado, los datos fueron organizados y expresados en valores absolutos, utilizando la media aritmética para obtener los valores promedio de cada prueba.

A continuación, se muestran las tablas que muestran los resultados de los respectivos recuentos de mesófilos aerobios, enterobacterias, mohos, levaduras, Salmonella spp., en las diferentes frutas. No se detectó la presencia de salmonella spp., en las muestras evaluadas. Se pudo observar que los recuentos para mesófilos aerobios fueron elevados en la mayoría de las frutas. Las muestras que presentaron mayor nivel de mesófilos aerobios fueron las frutillas y el durazno; y el que presentó menor nivel de mesófilos aerobios fue la uva.



#### 7.4.1 Limite microbiológico - DG-6

Agente microbiano	Límite de aceptación por g	Microorganismos sobrevivientes – desinfectante DG-6				Dictamen
		Uva	Frutilla	Durazno	Ciruela	
<b>Aerobios Mesófilos</b>	10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	APROBADO
<b>Enterobacterias Escherichia Coli</b>	10 <sup>2</sup>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO
<b>Salmonella sp.</b>	Ausencia/25 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO
<b>Mohos</b>	10 <sup>2</sup>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO
<b>Levaduras</b>	10 <sup>2</sup>	94	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO

- El desinfectante DG-6 cumple con los criterios de aceptación, en el análisis de limite microbiológico.

#### 7.4.2 Limite microbiológico - BIOSEP

Agente microbiano	Límite de aceptación por g	Microorganismos sobrevivientes – desinfectante BIOSEP				Dictamen
		Uva	Frutilla	Durazno	Ciruela	
<b>Aerobios Mesófilos</b>	10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	APROBADO
<b>Enterobacterias Escherichia Coli</b>	10 <sup>2</sup>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO
<b>Salmonella sp.</b>	Ausencia/25 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO
<b>Mohos</b>	10 <sup>2</sup>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO
<b>Levaduras</b>	10 <sup>2</sup>	74	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO

- El desinfectante Biosep cumple con los criterios de aceptación, en el análisis de limite microbiológico.



### 7.4.3 Limite microbiológico - GERMEX

Agente microbiano	Límite de aceptación por g	Microorganismos sobrevivientes – desinfectante GERMEX				Dictamen
		Uva	Frutilla	Durazno	Ciruela	
<b>Aerobios Mesófilos</b>	10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	< 10 <sup>6</sup>	APROBADO
<b>Enterobacterias Escherichia Coli</b>	10 <sup>2</sup>	Ausencia	24	14	Ausencia	APROBADO
<b>Salmonella sp.</b>	Ausencia/25 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO
<b>Mohos</b>	10 <sup>2</sup>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO
<b>Levaduras</b>	10 <sup>2</sup>	71	Ausencia	Ausencia	Ausencia	APROBADO

- El desinfectante Germex cumple con los criterios de aceptación, en el análisis de limite microbiológico.

### 7.5 Eficacia Antimicrobiana – Método del antibiograma Disco – placa

- **Determinación de Eficacia antimicrobiana para tres microorganismos diferentes (cepas ATCC) a las mismas concentraciones – 400 ppm**

A continuación, se muestran los resultados de la Eficacia antimicrobiana del método de antibiograma disco – placa, para tres tipos de microorganismos: S.aureus, Ecoli y C.albicans con las mismas concentraciones de los desinfectantes a evaluar. (Germex, Biosep y DG-6). Según la siguiente formula:

$$\%EA = \left( \frac{HI_m cm}{HI_E cm} \right) * 100$$

Las pruebas fueron realizadas por triplicado por lo que fue necesario determinar el promedio y desviación estándar de manera que podamos observar que no hay mayor diferencia entre las repeticiones realizadas guardando relación entre las mismas.



### 7.5.1 Eficacia Antimicrobiana - Germex

Resultados comparativos de la eficacia antimicrobiana - halos de inhibición expresado en centímetros del desinfectante Germex para los tres microorganismos a una concentración de 400 ppm.

N°1	ACTIVO	CEPA ATCC	Halos de inhibición en cm			PROM	DST	%EA Respecto al BIOSEP	%EA Respecto al DG-6
GERMEX	Cloruro de Alkil-Dimetil Bencil Amonio / HPMB 400 ppm	S. aureus	2,214	2,31	2,259	2,259	0,0455	95,29	151,13
		E. coli	1,313	1,32	1,315	1,315	0,002	93,35	131,94
		C. albicans	2,734	2,66	2,704	2,699	0,0383	97,35	135,84

Con los resultados obtenidos podemos observar que a una misma concentración 400 ppm de Germex que como principio activo contiene un amonio cuaternario de primera generación y una pequeña concentración de biguanida polimérica, este tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de las tres cepas de microorganismos lo cual se refleja en los halos de inhibición producidos, confirmando lo investigado en bibliografía que nos dice que al ser un amonio cuaternario de primera generación posee una mayor acción germicida ya sea en condiciones hostiles y su uso es totalmente seguro. En la tabla podemos observar el diámetro de los halos de inhibición de S. aureus y C. albicans que se produjeron, estos datos obtenidos nos dicen que los amonios cuaternarios de primera generación tienen mayor actividad frente a gram positivos y hongos en comparación con las bacterias gram negativa, que presentan unos halos de menor diámetro.

Se realizó un cálculo de la Eficacia antimicrobiana expresada en porcentaje en relación al Biosep y al DG-6, y se puede observar que existe una variación negativa menor del Germex con respecto al Biosep esto se debe a que el Biosep posee mayor actividad bactericida que el Germex, pero en una proporción menor. Así también se realizó el cálculo de la Eficacia Antimicrobiana del Germex respecto al DG-6 y observamos una diferencia positiva significativa, esto se debe a que la potencia bactericida del DG-6 es menor que la del Germex. *Ver figura 12.*





### 7.5.2 Eficacia Antimicrobiana – Biosep

Resultados comparativos de la eficacia antimicrobiana - halos de inhibición expresado en centímetros del desinfectante Biosep para los tres microorganismos a una concentración de 400 ppm.

N°2	ACTIVO	CEPA ATCC	Halos de inhibición en cm			PROM	DST	%EA Respecto al GERMEX	%EA Respecto al DG-6
			2,361	2,38	2,372				
BIOSEP	Cloruro de Alkil-Dimetil Bencil Amonio / HPMB 400 ppm	S. aureus	2,361	2,38	2,372	2,371	0,0095	104,94	158,60
		E. coli	1,479	1,34	1,409	1,409	0,0705	107,12	141,34
		C.albicans	2,762	2,78	2,774	2,772	0,0092	102,72	139,53

De la misma manera el principio activo del Biosep también es un amonio cuaternario de primera generación; cloruro de benzalconio y biguanida polimérica PHMB, se puede observar en la tabla que este desinfectante presenta alta efectividad en las tres cepas, pero presenta mayor grado de eficacia en bacterias gran positivas y Hongos levaduras, esto se debe a que los amonios cuaternarios presentan resistencia a las bacterias gram negativas. La desviación estándar nos muestra que no existe mayor diferencia entre las repeticiones por lo que la medida de los halos de inhibición presenta relación entre sí.

En la tabla también observamos el cálculo del porcentaje de eficacia frente al Germex y a DG-6, se observa que el porcentaje de eficacia es mayor al 100% esto quiere decir que supera en tamaño a los halos de inhibición del Germex en menor proporción, con el cálculo del porcentaje de eficacia en relación con la del DG-6 se observa un porcentaje de eficacia antimicrobiana muchísimo mayor al 100% esto quiere decir que el Biosep posee una eficacia significativamente mayor a la del DG-6. *Ver figura 12.*

### 7.5.3 Eficacia Antimicrobiana – DG-6

Resultados comparativos de la eficacia antimicrobiana - halos de inhibición expresado en centímetros del desinfectante DG-6 para los tres microorganismos a una concentración de 400 ppm.



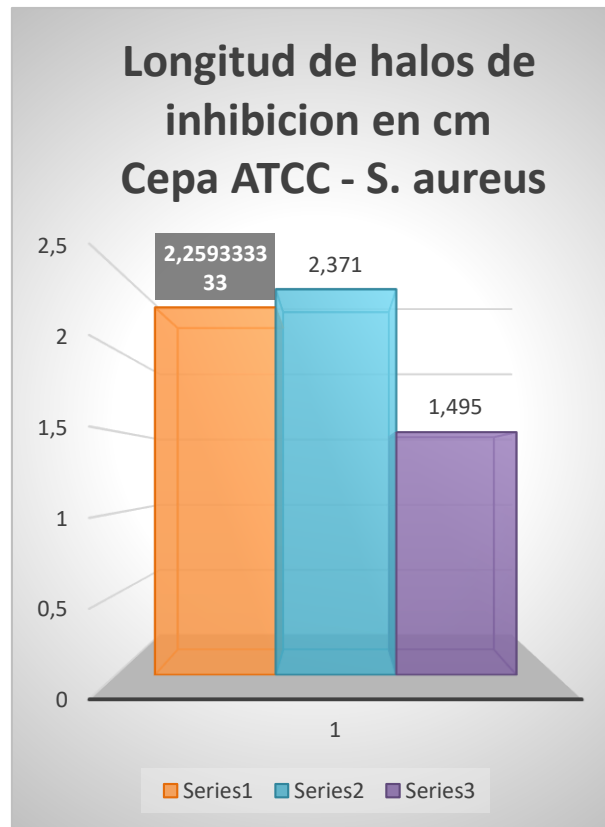


N°3	ACTIVO	CEPA ATCC	Halos de inhibición en cm			PROM	DST	%EA Respecto al GERMEX	%EA Respecto al BIOSEP
DG-6	Piridinio Cloruro 400 ppm	S. aureus	1,553	1,43	1,506	1,495	0,0642	66,17	63,05
		E. coli	0,958	1,02	1,009	0,997	0,0342	75,79	70,75
		C. albicans	1,981	1,99	1,987	1,987	0,0055	73,62	71,67

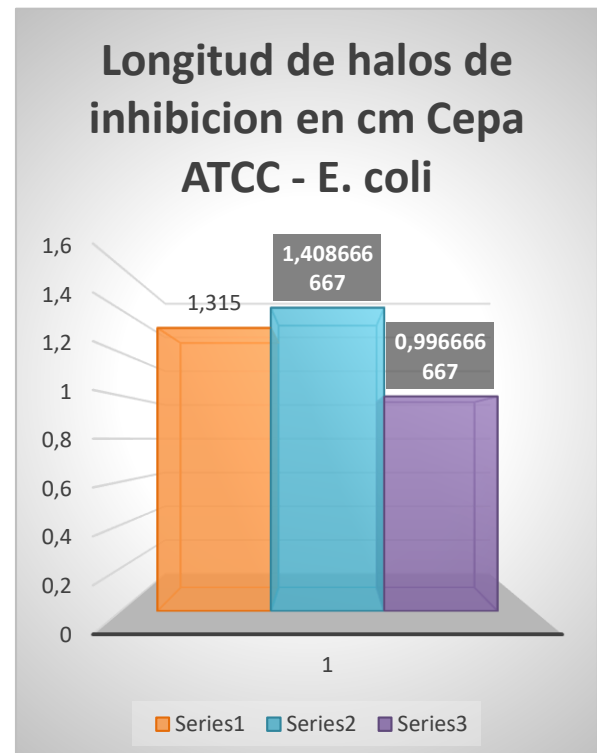
El principio activo del DG-6 es Piridinio cloruro, un amonio cuaternario incluido en el grupo de los tensioactivos, a diferencia del Germex y DG-6. El análisis in vitro presento los halos de inhibición expresada en cm, que se muestran en la tabla se puede observar que estos halos son de menor diámetro con respecto al DG-6 y al Biosep, por lo que realizando los cálculos para la determinación del porcentaje de eficacia antimicrobiana con respecto al Germex para las tres cepas estás llegan tan solo aproximadamente al 71,86% en promedio y con respecto al Biosep 68,49% en promedio. *Ver figura 12.*

**Grafica 9: Comparación de la acción bactericida de los desinfectantes sobre la cepa en estudio: Longitud de halos de inhibición en cm – Cepa Staphylococcus aureus**

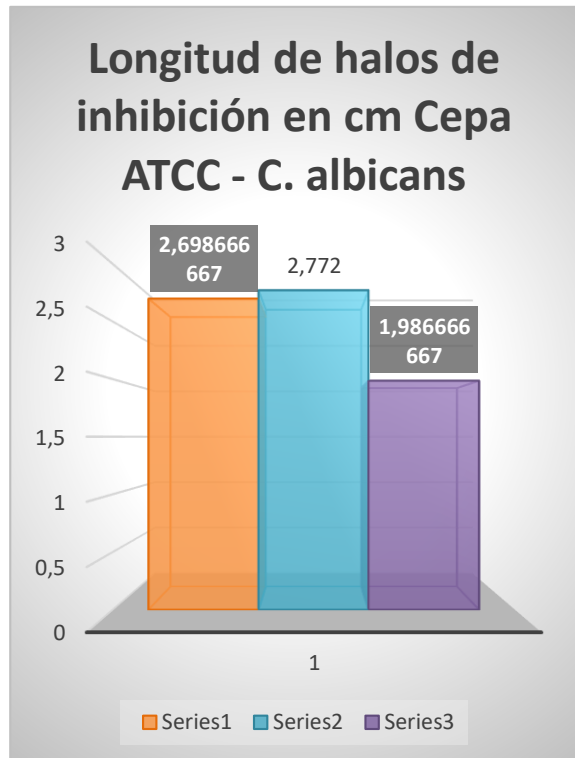
**Serie 1- Germex / Serie 2- Biosep / Serie 3- DG-6**



**Grafica 10: Comparación de la acción bactericida de los desinfectantes sobre la cepa en estudio: Longitud de halos de inhibición en cm – Cepa Escherichia Coli**  
Serie 1- Germex / Serie 2- Biosep / Serie 3- DG-6



**Grafica 11: Comparación de la acción bactericida de los desinfectantes sobre la cepa en estudio: Longitud de halos de inhibición en cm – Cepa Cándida albicans**



Serie 1- Germex / Serie 2- Biosep / Serie 3- DG-6

En las gráficas podemos observar una comparación en barras de la eficacia antimicrobiana de los desinfectantes: Germex, Biosep y DG-6 a una misma concentración 400 ppm sobre las cepas en estudio, se puede observar en las tres graficas que el Germex y Biosep presentan una mayor eficacia en *S. aureus*, *E.coli*, *c. albicans*; y una menor en el DG-6.

## 8 CONCLUSIONES

Se evaluó el efecto antimicrobiano in vitro de tres desinfectantes compuestos por amonios cuaternarios de primera generación empleados en la desinfección de vegetales y frutas: Biosep, DG-6 y Germex, a una misma concentración de uso (30 gotas en 1litro) y tiempo un minuto, con la finalidad de determinar la eficiencia germicida porcentual para comparar su potencia.

Así también se realizó el respectivo análisis de límite microbiológico en vegetales y frutas



posterior al procedimiento de desinfección para determinar si cumple con las especificaciones según criterios de aceptación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados, utilizados como referencia.

Se determinó la eficacia antimicrobiana mediante el método de antibiograma disco – placa a una misma concentración de los desinfectantes en estudio (400 ppm), para tres tipos de microorganismos diferentes: *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* (cepas ATCC), prueba que permitió realizar una comparación según la media aritmética del diámetro de halo de inhibición, la cual permitió determinar la eficacia porcentual entre estas.

Al comparar el efecto antimicrobiano de los desinfectantes se llega a la conclusión en términos generales que los tres cumplen con las especificaciones de aceptación, cumpliendo su función como desinfectantes de vegetales y frutas, sin embargo, en términos cuantitativos se logró determinar que el desinfectante Biosep y Germex presenta una actividad bactericida de mayor potencia que la del DG-6. Los resultados obtenidos fueron trazables en diferentes metodologías.

En cuanto a la posología o forma de administración del desinfectante de verduras y frutas Germex, se observa que el tiempo de desinfección sugerido de 30 gotas en un litro para un tiempo de un minuto logra una actividad bactericida altamente efectiva sin embargo, se sugiere que la forma de administración sea de 30 gotas en un litro para un tiempo mayor a un minuto para de esta forma garantizar la eficiencia germicida en vegetales y frutas.

## 9 RECOMENDACIONES

Se debe tomar en cuenta que no solo depende del desinfectante a utilizar sino también del procedimiento ya que este dependerá de la eficacia del desinfectante, por ejemplo, en el caso del procedimiento de desinfección de vegetales y frutas es importante realizar un lavado de estos para eliminar cualquier residuo o materia orgánica que estuviera en la superficie, para posteriormente exponerlo al desinfectante de verduras y frutas en un tiempo recomendado.

Si bien es conocido que para algunos desinfectantes el aumento de temperatura puede hacer que incremente su eficacia, sin embargo, se recomienda prepararlos a temperatura



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE TECNOLOGÍA  
CARRERA DE QUIMICA INDUSTRIAL**



ambiente de manera de no degradar el principio activo ya que si se desconoce la naturaleza del desinfectante la actividad germicida podría salir perjudicada.

El tiempo de reposo de los vegetales y frutas en la solución desinfectante no debe exceder del tiempo recomendado según prospecto ya que este puede alterar las propiedades de los alimentos.

Según la normativa vigente determina que se debe realizar un aclarado posterior a la aplicación de estos desinfectantes en alimentos para garantizar que no queden restos amonios cuaternarios que puedan contaminar al alimento.

Tomando en cuenta los resultados del análisis en uso e in vitro de los desinfectantes se recomienda mejorar la fórmula del producto Germex de manera de potenciar ligeramente su actividad bactericida.



## 10 BIBLIOGRAFIA

Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, vol. 18, núm. 1, 2017, pp. 9-22  
Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, S.C. Hermosillo, México

W. A. Jacobs, 1916. The Bactericidal properties of the quaternary salts of hexamethyltetramine. I. The problem of the chemotherapy of experimental bacterial infections. J. Exp. Med., 23: 563-568.

G. Domagk, 1935. Eine neue Klasse von Desinfektionsmitteln. Dtsch. Med. Wochschr., 61: 828-832.

Russell A D. Mechanisms of bacterial resistance to biocides. Int Biodeterior Biodegrad. 1995.

Manual de Desinfectantes <http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema07.pdf>

DESINFECTANTES UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA: Características, modo de actuación y aspectos que inciden en su eficacia - Betelgeux

Características de un desinfectante ideal  
<http://www.academia.cat/societats/farmcl/l libre/higiene/332.pdf>

S. Langsrud G. Sundheim R. Borgmann-Strahsen, 2003. Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related Pseudomonas spp.

Evolución y características de los amonios cuaternarios para desinfección de superficies; Proquimia, D. Calvente. Disponible en: [www.proquimia.com](http://www.proquimia.com)

Farmacopea Americana – USP 38. Pruebas de eficacia antimicrobiana Páginas: 109-143.

11 ANEXOS

Figura N°1

Aspectos fisicoquímicos - pH de los desinfectantes de frutas y verduras.

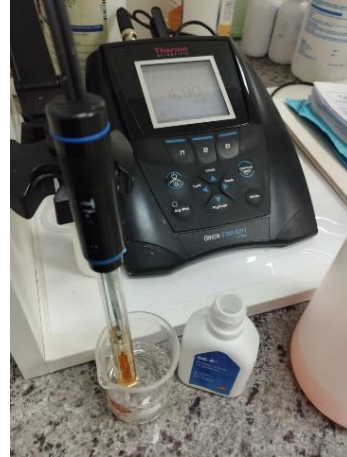


Figura N°2

Vegetales y frutas seleccionados y agrupados, necesarias para las pruebas.





Figura N°3

Soluciones desinfectantes de amonios cuaternarios y preparación de diluciones, requeridos para las pruebas.



Figura N°4

Procedimiento de desinfección de vegetales y frutas seleccionados.





Figura N°5

Recuento microbiano, siembra en diluciones seriadas – Determinación Mesófilos aerobios y factor de dilución.

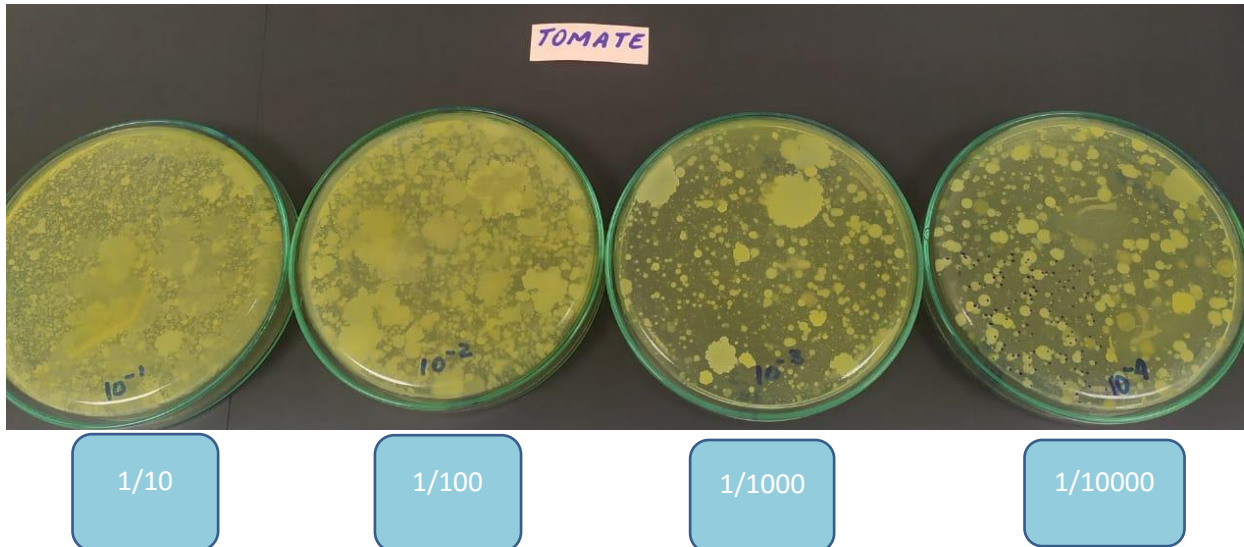


Figura N°6

Pruebas de limite microbiológico en vegetales (lechuga) – determinación de Mesófilos aerobios.

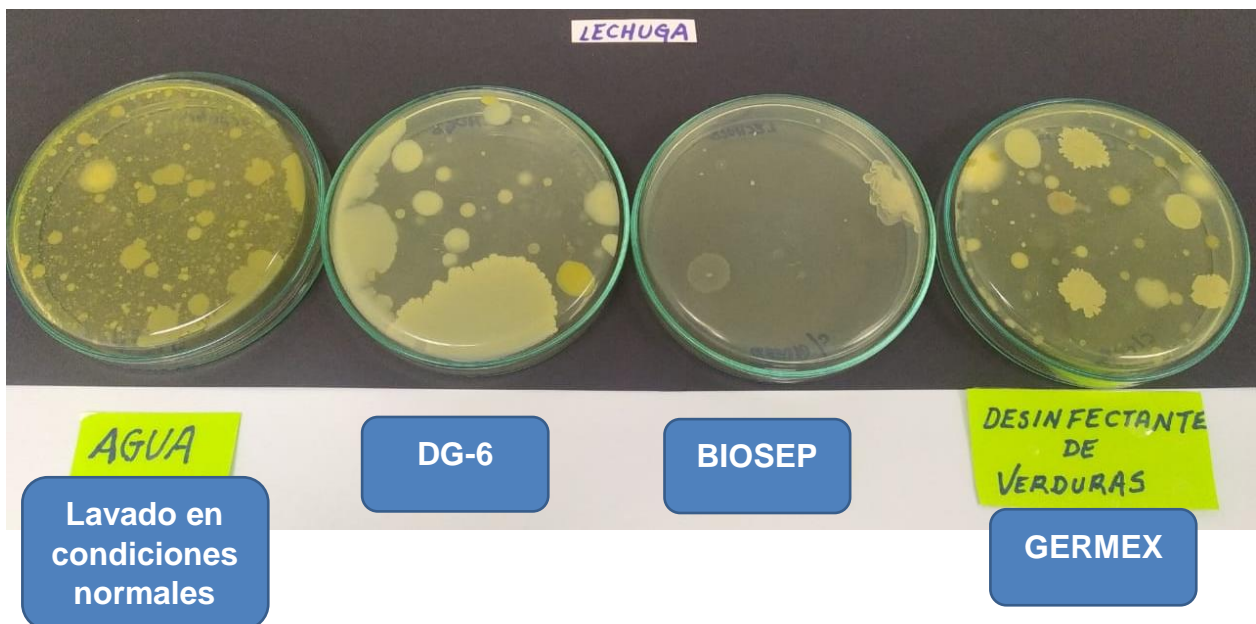


Figura N°7

Pruebas de limite microbiológico – Aislamiento microbiano: enterobacterias

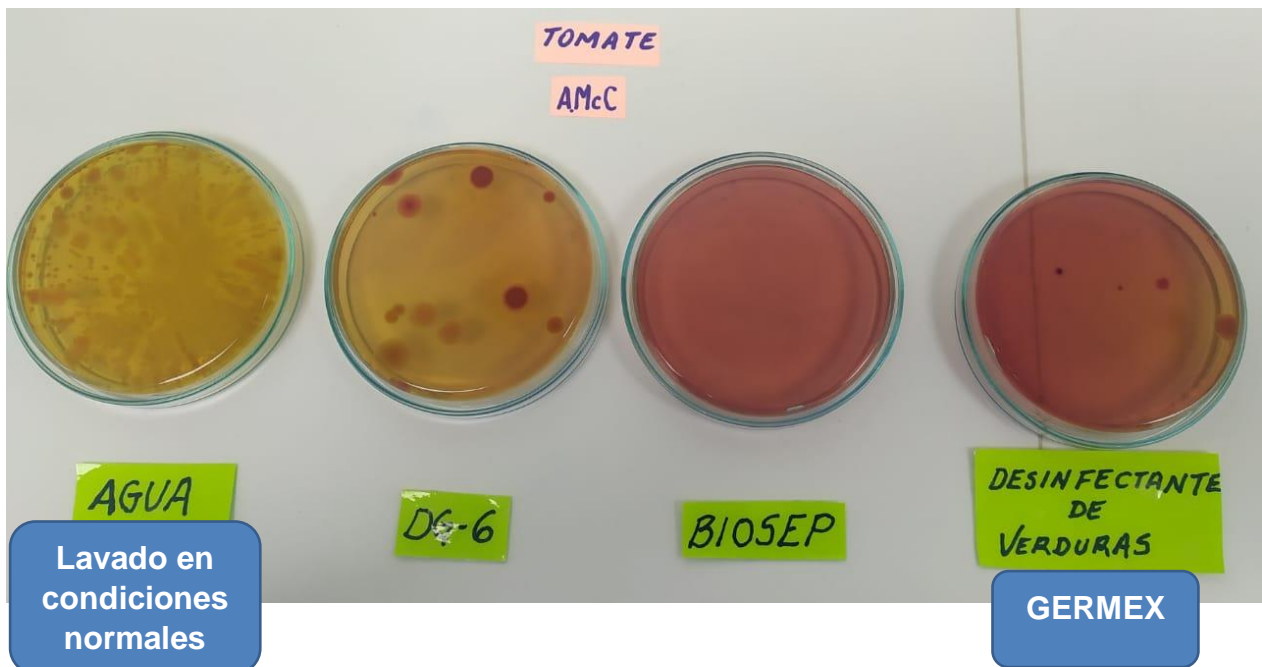
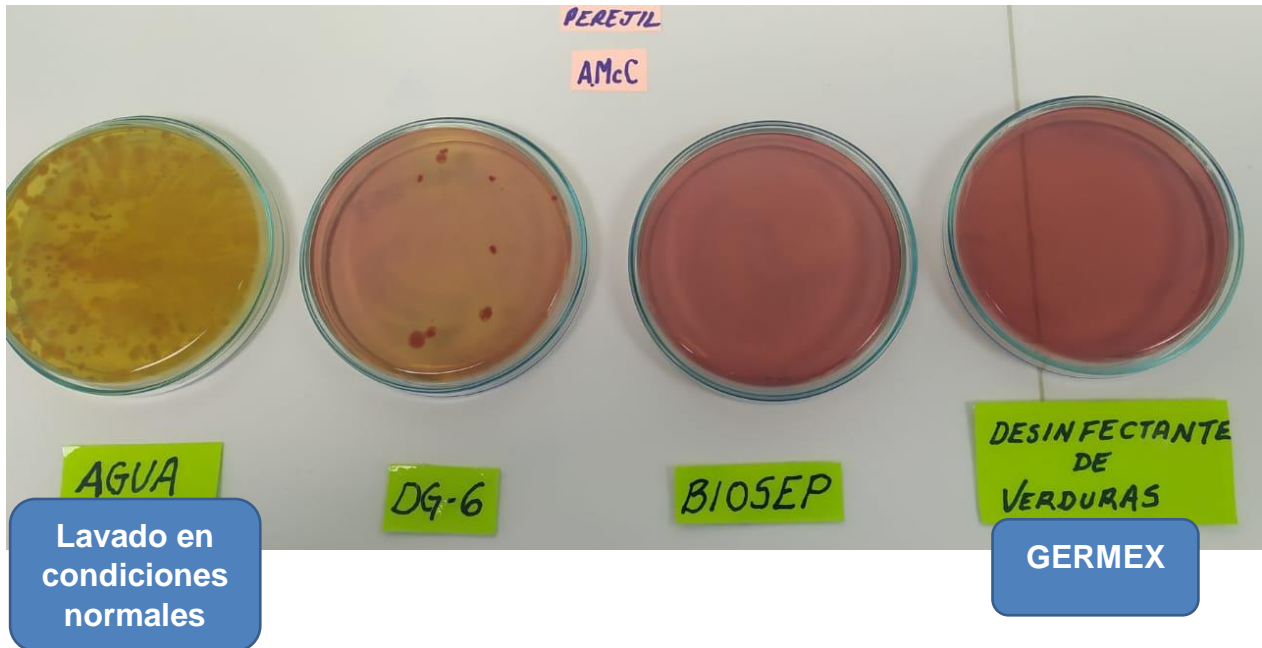


Figura N°8

Pruebas de limite microbiológico – Aislamiento microbiano: Mohos, Levaduras

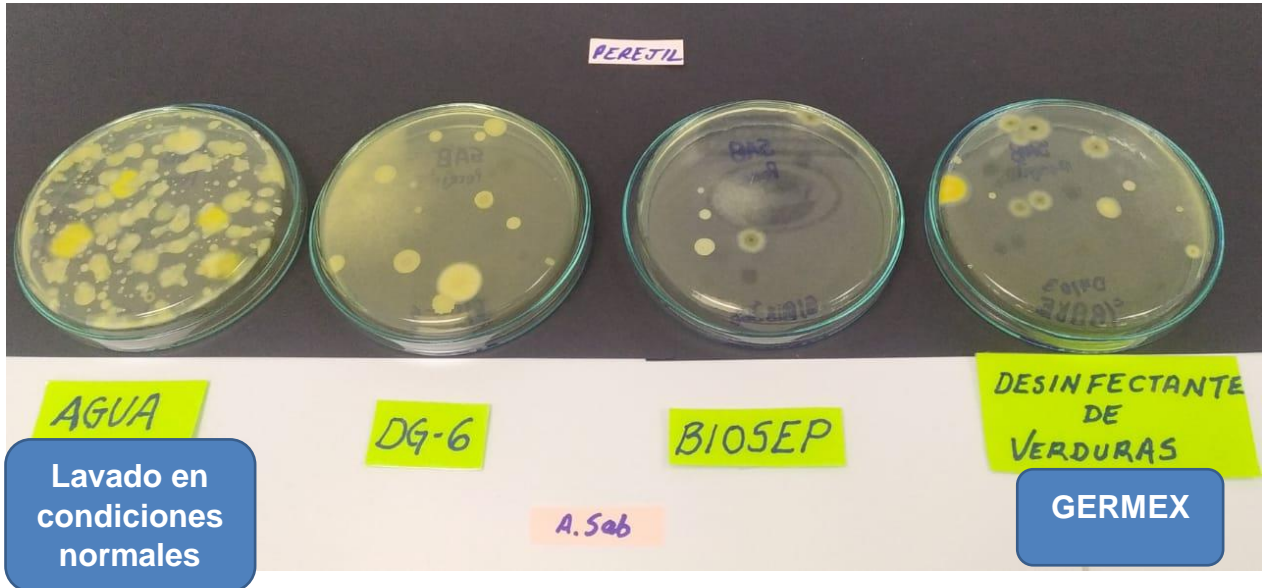


Figura N°9

Pruebas de Limite microbiológico – Aislamiento microbiano: Salmonella sp.

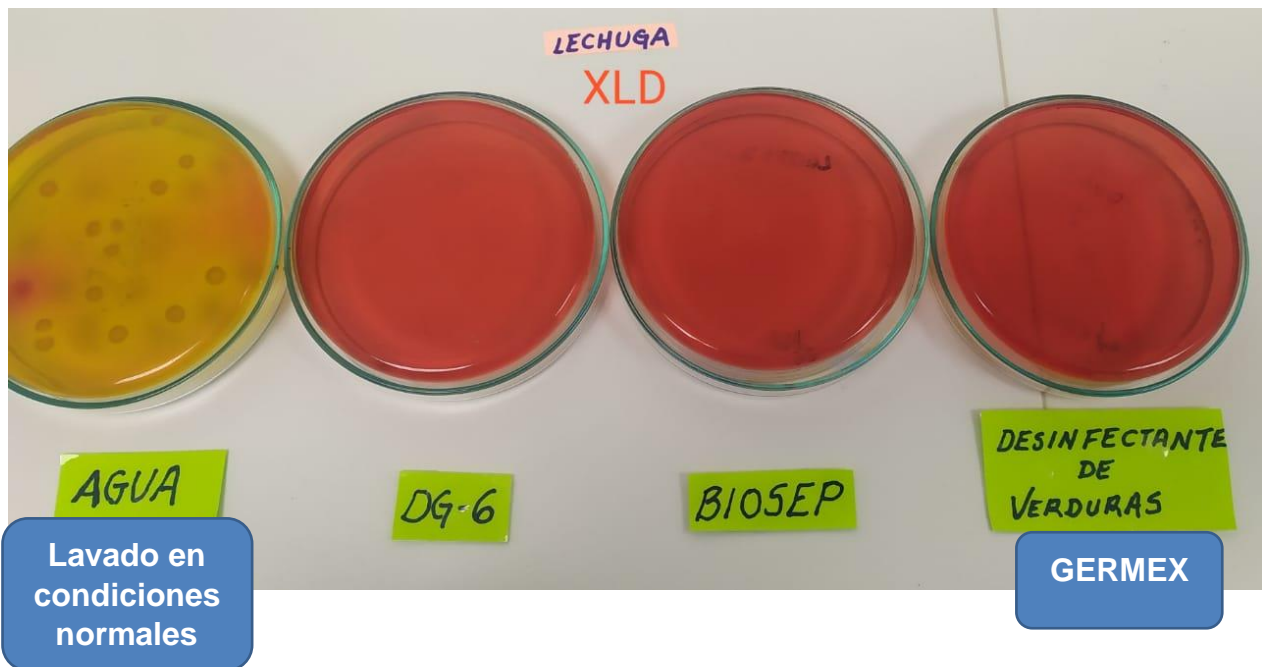




Figura N°10

Pruebas de Limite microbiologico – Aislamiento microbiano: Estafilococos.

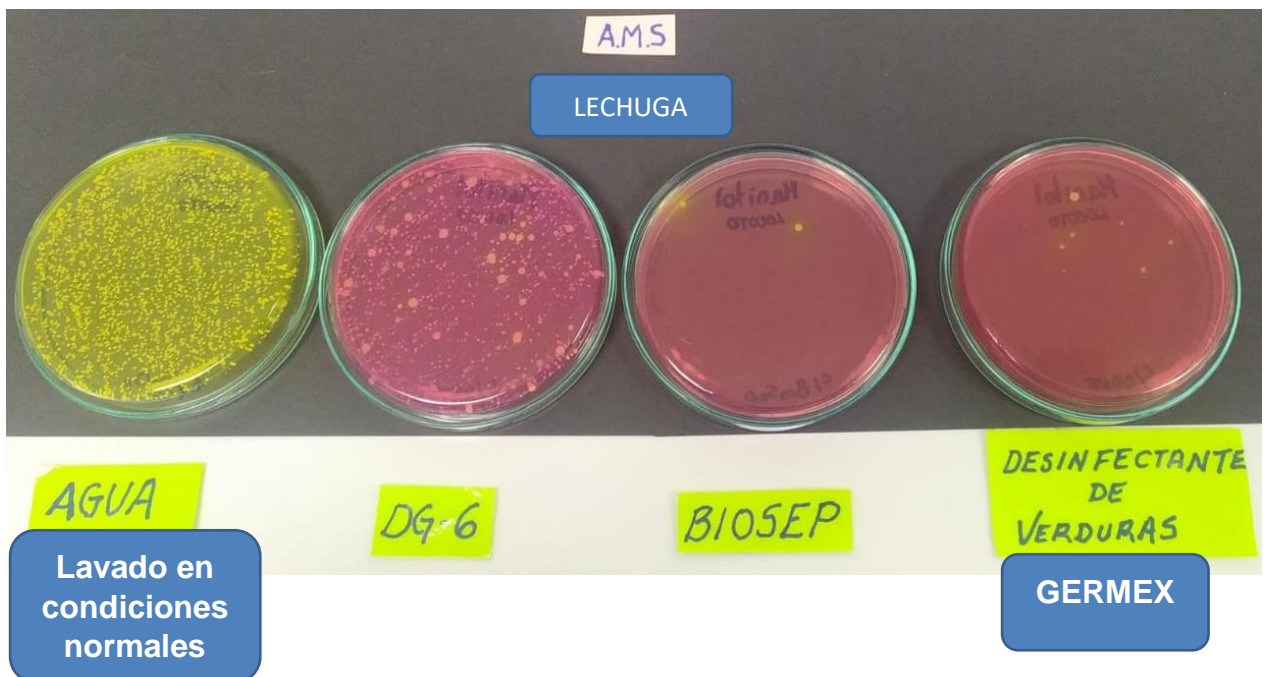
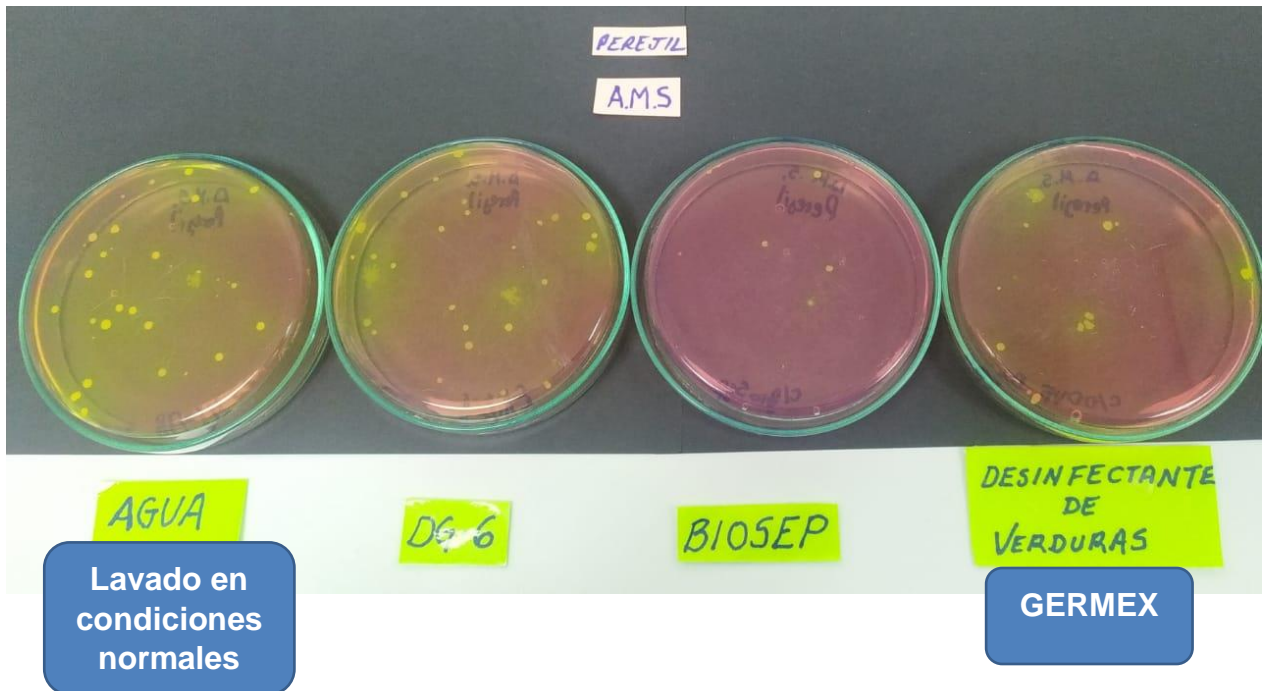


Figura N°11

Eficacia antimicrobiana - Método del antibiograma Disco – placa, para tres microorganismos diferentes (cepas ATCC) / Preparación de las suspensiones bacterianas a la escala de Mc Farland 0.5.



Figura N°12

Eficacia antimicrobiana - Método del antibiograma Disco – placa, Halos de inhibición de los desinfectantes a una misma concentración (400 ppm), en Cepas ATCC: S.aureus; E.coli; C. albicans.

