

**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD Y ESTABILIDAD FÍSICA DE CUATRO  
PROTOTIPOS DE UN DESINFECTANTE LÍQUIDO HOMOGÉNEO**

**SARA JIMENA MEDINA SARRIA**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS  
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA  
SANTIAGO DE CALI, VALLE  
2016**

**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD Y ESTABILIDAD FÍSICA DE CUATRO  
PROTOTIPOS DE UN DESINFECTANTE LÍQUIDO HOMOGÉNEO**

**SARA JIMENA MEDINA SARRIA**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE PREGRADO EN  
QUÍMICA FARMACÉUTICA**

**TUTOR: CONSTAIN HUGO SALAMANCA Ph.D.**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS  
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA  
SANTIAGO DE CALI, VALLE  
2016**



**Aprobado Por:**

---

**Nombre del correspondiente**  
**Evaluador**

---

**Nombre del correspondiente**  
**Evaluador**

---

**Constain Hugo Salamanca Mejía Ph.D.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al profesor Constain Hugo Salamanca por su apoyo y aporte vital para este trabajo y a las personas de la Universidad ICESI que contribuyeron.

## Contenido

Resumen.....	8
Abstract .....	9
1 Introducción .....	10
2 Planteamiento del problema .....	11
3 Marco teórico .....	12
4 Objetivos .....	17
4.1 Objetivo general.....	17
4.1.1 Objetivos Específicos .....	17
5 Metodología.....	18
5.1 Materiales .....	18
5.2 Métodos .....	18
5.2.1 Caracterización térmica de las materias primas .....	18
5.2.2 Preparación de los cuatro prototipos.....	18
5.2.3 Estudio de estabilidad acelerada.....	19
5.2.4 Prueba de concentración mínima inhibitoria.....	20
5.2.5 Matriz de marco lógico .....	21
6 Resultados y Discusión .....	24
6.1 Primer estudio de la efectividad antimicrobiana de los cuatro prototipos.....	24
6.2 Estudio de la efectividad de los cuatro prototipos a tiempo cero.....	25
6.2.1 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para el Prototipo 1.....	26
6.2.2 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para el Prototipo 2.....	27
6.2.3 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para el Prototipo 3.....	28
6.2.4 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para el Prototipo 4.....	29
6.2.5 Absorbancia Prototipos semana cero.....	32
6.3 Segundo estudio de la efectividad antimicrobiana de los cuatro prototipos.....	35
6.3.1 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para el Prototipo 1.....	35

6.3.2	Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para el Prototipo 2.....	36
6.3.3	Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para el Prototipo 3.....	37
6.3.4	Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para el Prototipo 4.....	38
6.4	Absorbancia Prototipos semana veintidós .....	41
6.5	Caracterización de las materias primas por calorimetría diferencial de barrido.....	43
7	Conclusiones .....	47
8	Recomendaciones .....	48
9	Bibliografía.....	49
a.	Anexos.....	51

#### Lista de tablas

Tabla 1.	Prototipo 1, 2, 3 y 4 de un desinfectante líquido homogéneo .....	18
Tabla 2.	Matriz marco lógico .....	21
Tabla 3.	Resultados obtenidos para el fenol 5% en Salmonella tiphy.....	24
Tabla 4.	Resultados obtenidos para el fenol 5% en Staphylococcus aureus.....	24
Tabla 5.	Resultados obtenidos para el fenol 5% en Pseudomona aeruginosa .....	24
Tabla 6.	Resultados obtenidos para el Prototipo 1 en Salmonella tiphy .....	26
Tabla 7.	Resultados obtenidos para el Prototipo 1 en Staphylococcus aureus .....	26
Tabla 8.	Resultados obtenidos para el Prototipo 1 en Pseudomona aeruginosa..	27
Tabla 9.	Resultados obtenidos para el Prototipo 2 en Salmonella tiphy .....	27
Tabla 10.	Resultados obtenidos para el Prototipo 2 en Staphylococcus aureus ..	27
Tabla 11.	Resultados obtenidos para el Prototipo 2 en Pseudomona aeruginosa	28
Tabla 12.	Resultados obtenidos para el Prototipo 3 en Salmonella tiphy .....	28
Tabla 13.	Resultados obtenidos para el Prototipo 3 en Staphylococcus aureus ..	28
Tabla 14.	Resultados obtenidos para el Prototipo 3 en Pseudomona aeruginosa	29
Tabla 15.	Resultados obtenidos para el Prototipo 4 en Salmonella tiphy .....	29
Tabla 16.	Resultados obtenidos para el Prototipo 4 en Staphylococcus aureus ..	29
Tabla 17.	Resultados obtenidos para el Prototipo 4 en Pseudomona aeruginosa	30
Tabla 18.	Resultados finales de la Concentración Mínima Inhibitoria para el primer análisis de la efectividad .....	30
Tabla 19.	Resultados obtenidos para el Prototipo 1 en Salmonella tiphy .....	35
Tabla 20.	Resultados obtenidos para el Prototipo 1 en Staphylococcus aureus ..	35
Tabla 21.	Resultados obtenidos para el Prototipo 1 en Pseudomona aeruginosa	35
Tabla 22.	Resultados obtenidos para el Prototipo 2 en Salmonella tiphy .....	36
Tabla 23.	Resultados obtenidos para el Prototipo 2 en Staphylococcus aureus ..	36
Tabla 24.	Resultados obtenidos para el Prototipo 2 en Pseudomona aeruginosa	36

Tabla 25. Resultados obtenidos para el Prototipo 3 en Salmonella tiphy .....	37
Tabla 26. Resultados obtenidos para el Prototipo 3 en Staphylococcus aureus ..	37
Tabla 27. Resultados obtenidos para el Prototipo 3 en Pseudomona aeruginosa	37
Tabla 28. Resultados obtenidos para el Prototipo 4 en Salmonella tiphy .....	38
Tabla 29. Resultados obtenidos para el Prototipo 4 en Staphylococcus aureus ..	38
Tabla 30. Resultados obtenidos para el Prototipo 4 en Pseudomona aeruginosa	38
Tabla 31. Resultados finales de la Concentración Mínima Inhibitoria para el segundo análisis de la efectividad .....	39

### **Lista de figuras**

Figura 1. Estructura química del Cloruro de Benzalconio .....	14
Figura 2. Espectro de Absorbancia Prototipo 1 .....	33
Figura 3. Espectro de Absorbancia Prototipo 2 .....	33
Figura 4. Espectro de Absorbancia Prototipo 3 .....	34
Figura 5. Espectro de Absorbancia Prototipo 4 .....	34
Figura 6. Espectro de Absorbancia Prototipo 1 .....	41
Figura 7. Espectro de Absorbancia Prototipo 2 .....	42
Figura 8. Espectro de Absorbancia Prototipo 3 .....	42
Figura 9. Espectro de Absorbancia Prototipo 4 .....	43
Figura 10. Termogramas de las materias primas Metilparabeno, propilparabeno, EDTA, color amarillo, mezcla de las materias primas con y sin EDTA .....	44

### **Lista de gráficas**

Gráfica 1. CMI del fenol al 5% .....	31
Gráfica 2. CMI de los cuatro prototipos en la semana cero .....	32
Gráfica 3. CMI del fenol al 5% .....	40
Gráfica 4. CMI para los cuatro prototipos en la semana 22 .....	40

### **Lista de anexos**

Anexo 1. Termograma del Color amarillo .....	51
Anexo 2. Termograma del Edetato disódico .....	51
Anexo 3. Termograma del Metilparabeno .....	52
Anexo 4. Termograma del Propilparabeno .....	52
Anexo 5. Termograma de la Mezcla de Metilparabeno, propilparabeno y color amarillo .....	53
Anexo 6. Termograma de la Mezcla de Metilparabeno, propilparabeno, EDTA y color amarillo.....	53

## Resumen

Los productos de aseo y limpieza son utilizados ampliamente en la sociedad y son una indispensable herramienta como método de prevención primaria en salud, cuyo objetivo es limitar la incidencia de enfermedades mediante el control de sus causas y de los factores de riesgo, tales como contaminación en el suelo, agua y aire, hábitos personales, entre otros. En este proyecto se diseñaron y elaboraron cuatro prototipos de un producto desinfectante líquido homogéneo para superficies inanimadas, donde se evaluó la respuesta en la efectividad y la cosolencia del producto, variando algunas materias primas dentro de la formulación. La evaluación de la actividad antimicrobiana, se realizó por medio de la prueba de concentración mínima inhibitoria indicada por la Norma Técnica Colombiana 2455.

Además se evaluó la estabilidad física del desinfectante líquido en condiciones de estrés (Temperatura:  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , Humedad Relativa:  $75 \pm 5\%$ ). Los cuales se realizaron durante cinco meses, en envase cerrado. Se encontró que los cuatro prototipos cumplen con la prueba de concentración mínima inhibitoria durante todo el tiempo de estudio, además de mantener unas apropiadas características de estabilidad.

**Palabras clave:** desinfectante, concentración mínima inhibitoria, estabilidad, efectividad.



## **Abstract**

Cleaning and care products are widely used in society and are an indispensable tool as a primary prevention method in health, whose objective is to limit the incidence of diseases by controlling their causes and risk factors, such as contamination in soil, water and air, personal habits, among others. In this project four prototypes of a homogeneous liquid disinfectant product for inanimate surfaces were designed and elaborated, where the response in the effectiveness and co-solvency of the product was evaluated, varying some raw materials within the formulation. The evaluation of antimicrobial activity was carried out by means of the minimum inhibitory concentration test indicated by NTC 2455.

In addition, the physical stability of the liquid disinfectant under stress conditions was evaluated (Temperature:  $40 \pm 2$  ° C, Relative Humidity:  $75 \pm 5\%$ ). These were carried out for five months in a closed container. It was found that all four prototypes comply with the minimum inhibitory concentration test throughout the study time, in addition to maintaining appropriate stability characteristics.

**Key words:** disinfectant, minimum inhibitory concentration, stability, effectiveness

## 1 Introducción

La desinfección es un proceso que consiste en la eliminación parcial de microorganismos infecciosos mediante el uso de agentes químicos o físicos, estos se aplican sobre superficies o materiales inertes o inanimados, debido a los efectos tóxicos o irritantes que pueden tener sobre los organismos vivos. Los desinfectantes modernos se componen de formulaciones complejas que comprenden sustancias químicas, jabones, detergentes y compuestos que favorecen la penetración de las sustancias activas. Existen varias definiciones sobre los productos de aseo y limpieza, como los son los antisépticos, soluciones limpiadoras, agente esterilizantes y biocidas; los cuales se distinguen por su composición y grado de concentración de sus sustancias químicas, también por el tiempo durante el cual se ha de mantener el producto en contacto con las superficies a tratar, el nivel de residuos que se puede aceptar y el entorno en el que se desarrolla el proceso. (Kahrs, 1995)

El mecanismo de acción de los desinfectantes depende de tres mecanismos básicos: (1) Capacidad de coagular y precipitar proteínas, (2) Alterar las características de permeabilidad celular y (3) toxicidad o envenenamiento de los sistemas enzimáticos de las bacterias. Produciendo así la muerte o inhibición celular de las bacterias por oxidación, hidrólisis o inactivación de enzimas, con pérdida de los constituyentes celulares. (Sanchez & Saenz, 2005) Los criterios de selección de un desinfectante ideal deben basarse primordialmente en su baja toxicidad, solubilidad en agua y amplio espectro, otros criterios recomendables son: bajo costo, disponibilidad, estabilidad, sin olor desagradable, no generar resistencia y ser no corrosivo.

La efectividad de estos productos depende directamente de la concentración del agente y del tiempo de actuación, de esta manera, al aumentar la temperatura aumenta la acción desinfectante. El pH es otro valor a tener en cuenta, ya que las formas ionizadas de los agentes dissociables son más efectivas al pasar mejor a través de las membranas biológicas, donde los agentes aniónicos son más activos a pH ácido y los catiónicos a pH alcalino. Además, la presencia de residuos orgánicos en la zona a tratar como por ejemplo suero, sangre y pus, puede dificultar la acción antiséptica de estos productos. (Bosquet, 2015) Debido a lo anterior, en este proyecto se realizó la evaluación de la efectividad de cuatro prototipos de un desinfectante líquido homogéneo, para lo cual fue necesario realizar la prueba de concentración mínima inhibitoria CMI para identificar si la concentración usada del ingrediente activo es la correcta para reducir el número de microorganismos patógenos presentes en superficies inanimadas. Por otro lado, se realizó a los cuatro prototipos un estudio de estabilidad acelerada, para así evaluar si las propiedades físicas del producto se mantienen estables en condiciones de estrés a través del tiempo.

## 2 Planteamiento del problema

Los antisépticos y desinfectantes se usan ampliamente en los hogares, hospitales, centros de salud y laboratorios en los procesos de control y desinfección, y sobre todo en la prevención de enfermedades infecciosas. Por lo anterior el uso de estos productos se han convertido en una herramienta indispensable para mantener los lugares libres de agentes contaminantes que puedan causar daño al bienestar y salud de las personas expuestas. Sin embargo, gran parte del desarrollo de estos productos en nuestro país se han basado en metodologías de desarrollo artesanal, esto se debe a diversos factores tales como la poca inversión en las áreas de investigación, desarrollo e innovación, por parte de los sectores industriales, académicos y del gobierno, falta de recurso humano con estudios de postgrado, como maestrías y doctorados.(Cabrera, Gómez, & Zúñiga, 2007)

Por lo anterior este proyecto nace como iniciativa de innovación y liderazgo, proponiendo un diseño basado en principios estadísticos y fisicoquímicos, con el fin de brindar un procedimiento experimental para el diseño y formulación de estos productos, a partir de la aplicación del conocimiento científico. Por medio del presente proyecto, se desea realizar cuatro prototipos de un producto desinfectante, estableciendo las mejores condiciones de formulación para su desarrollo, por medio de estudios de estabilidad y efectividad.

Por tanto se debe realizar una revisión bibliográfica que sustente el componente experimental del proyecto, para el diseño y producción del producto desinfectante. Siendo así, el proyecto una base para futuros productos en el área de cosméticos de aseo y limpieza, que permita implementar nuevas estrategias de producción, procedimientos y herramientas para la mejora en la calidad y alcance de especificaciones.

### 3 Marco teórico

La limpieza es un factor esencial tanto para los hogares como para las entidades de salud, ya que estos están destinados para la prevención y control de infecciones. Los mecanismos más utilizados para la eliminación de estos organismos contaminantes son la desinfección, antisepsia y esterilización. La desinfección es un procedimiento que utiliza técnicas físicas y químicas, permitiendo eliminar, matar, inactivar o inhibir a un gran número de microorganismos encontrados en el ambiente. La antisepsia disminuye por medio de sustancias químicas los agentes contaminantes impidiendo su proliferación, y por último la esterilización es la inexistencia absoluta de un microorganismo. (Rodríguez Pérez, 2006) (M., 2015)

La desinfección en ocasiones se confunde con la esterilización debido a que existen varios niveles de desinfección, desde una esterilización química a una mínima reducción del número de microorganismos contaminantes. (Hoyos Serrano, 2014)

a. Desinfección de alto nivel

Elimina todos los organismos, por lo que en condiciones especiales pueden esterilizar, entre ellos están: glutaraldehído, ácido paracético, dióxido de cloro, peróxido de hidrogeno, formaldehido, entre otros.

b. Desinfección de nivel intermedio

Elimina solo bacterias vegetativas y algunas esporas bacterianas, entre ellos se encuentran los fenoles y el hipoclorito de sodio.

c. Desinfección de bajo nivel

Elimina bacterias vegetativas, hongos y algunos virus en un periodo de tiempo corto, como por ejemplo el grupo de amonios cuaternarios.

#### Métodos de desinfección

a. Métodos físicos: se suelen utilizar métodos como la pasteurización, chorro de agua y radiación ultravioleta.

b. Métodos químicos: uso común de desinfectantes, estos son considerados sustancias químicas que se usan en objetos inanimados y superficies inertes para eliminar microorganismo, excepto esporas.

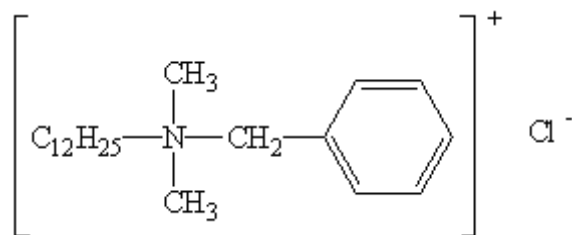
Así mismo los desinfectantes pueden clasificarse de acuerdo a su mecanismo de acción en: (Sanchez & Saenz, 2005)

- **Agentes que dañan la membrana**

1. Detergentes

- a. Catiónicos
- b. Aniónicos
- c. No iónicos
- 2. Compuestos fenólicos
  - a. Fenol
  - b. Cresol
  - c. Difenilos halogenados
  - d. Aceites esenciales de plantas
- 3. Alcoholes
  - a. Etanol
  - b. Isopropanol
- **Agentes que destruyen las proteínas**
  - 1. Ácidos y bases fuertes
  - 2. Ácidos orgánicos no disociables
- **Agentes modificadores de grupos funcionales**
  - 1. Metales pesados
  - 2. Agentes oxidantes
    - a. Permanganato de potasio
    - b. Acido paracético
    - c. Agua oxigenada
  - 3. Colorantes
  - 4. Agentes alquilantes
    - a. Formaldehido
    - b. Glutaraldehído
    - c. Oxido de etileno

Los productos de aseo y limpieza desarrollados actualmente contienen como desinfectante los compuestos de amonio cuaternario, por su baja toxicidad y su excelente eficacia frente a gérmenes Gram-positivos principalmente. El cloruro de benzalconio es uno de los más conocidos son generalmente incoloros, inodoros, no irritantes y desodorantes. También tienen una acción detergente y son buenos desinfectantes. Son solubles en agua y alcohol. Su mecanismo de acción consiste en unirse de forma irreversible a los fosfolípidos y proteínas de la membrana dañando su permeabilidad y alterando la distribución de las cargas en la membrana, conduciendo a una fuga de los organelos plasmáticos que producirá la muerte bacteriana. Debido a su amplia propagación en el mercado, estos compuestos han experimentado una rápida evolución y desarrollo encontrándose agentes de amonio cuaternario con cadenas dodecil más modernos y ya comercializados, con una acción antimicrobiana más potente, un mayor espectro de actividad y una más baja toxicidad. (J. Rueda, 2003)



**Figura 1. Estructura química del Cloruro de Benzalconio**

Se han realizados varios estudios donde se comprueba que la actividad de los amonios cuaternarios y sus propiedades fisicoquímicas dependen enormemente de la longitud de sus cadenas en su estructura química, por lo que se demuestra una mayor eficacia frente agentes Gram-positivos que frente a Gram-negativos. (J. Rueda, 2003). No tiene acción sobre las micobacterias, ni son esporicidas. Su actividad la desarrollan tanto sobre el medio ácido como alcalino, aunque en éste último muestra mejores acciones. No obstante se ha reportado que la función del cloruro de benzalconio se encuentra ineficaz frente algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Trichophyton interdigitale*, y *T.rubrum*. Sin embargo, en combinación con algunos conservantes y excipientes, como el edetato disódico, alcohol bencilico y feniletanol, se aumenta la actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Por otro lado, el cloruro de benzalconio es relativamente inactivo contra las esporas y mohos, pero es activo contra algunos virus como el VIH. (Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009)

Algunos de los usos más comunes del cloruro de benzalconio como antiséptico y desinfectante de la piel, material de industria alimentaria y farmacéutica e incorporada también en algunos compuestos cosméticos son:

- Desinfección preoperatoria de la piel intacta.
- Aplicación en membranas mucosas.
- Desinfección de superficies no críticas.
- Acción desodorante.
- Limpieza de superficies ásperas o difíciles.

Una de las herramientas más utilizadas para medir la efectividad de productos desinfectantes es la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria, esta prueba consiste en determinar cuál es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. Por lo que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es importante en diagnósticos para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente microbiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos. (J. Rueda, 2003)

La prueba de Concentración Mínima Inhibitoria es uno de los requisitos que debe cumplir un desinfectante para uso domestico, según la normativa en Colombia. De esta manera estos productos deben reunir ciertas características:

- Ser miscible en agua a las concentraciones de uso
- Debe ser estable a las condiciones de uso y almacenamiento
- Si la formula contiene un colorante, la superficie tratada no debe quedar coloreada luego de su enjuague
- Debe tener una baja toxicidad en uso doméstico
- No debe deteriorar las superficies o elementos tratados
- Debe tener una Concentración Mínima Inhibitoria menor o igual a la que presenta el fenol al 5%

Por tanto, la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria permite optimizar el uso de los desinfectantes y maximizar la eficacia de las medidas de desinfección, sirve para el diseño de los esquemas de limpieza, sanitización y desinfección. (2455, 2000)

Otro aspecto importante en la valoración de desinfectantes además de la efectividad, es la estabilidad del producto a través del tiempo en condiciones medioambientales. La evaluación de la estabilidad es un factor fundamental para obtener un producto de buena calidad, esto puede medirse a través de un estudio de estabilidad acelerada que tiene por objeto verificar, en condiciones específicas y controladas la capacidad de un producto para mantener las mismas características y propiedades durante su vida útil. (Soler Roger, Rodriguez Perdomo, Pérez Bueno, Riverón Alemán, & Morales Lacarrere, 2011)

Las razones para realizar estos estudios de estabilidad son principalmente legales ya que todos los productos deben cumplir con las condiciones de identidad, efectividad y potencia durante el periodo que se encuentra en el mercado y hasta el momento de ser usados. Otro de los motivos son económicos, una buena aceptación del cliente respecto a su presentación y características organolépticas. Por lo anterior se somete a los productos a un envejecimiento acelerado, donde los factores que se pueden alterar con el tiempo son: temperatura, radiaciones, humedad, oxígeno, presión, entre otros.

Generalmente, los procesos de degradación son reacciones químicas que consumen energía y pueden acelerarse por el aumento de la temperatura. La mayoría de los métodos de envejecimiento acelerado toman en cuenta este hecho, por lo que se basa en mediciones de la velocidad de degradación a temperaturas superiores de lo normal, para así poder sacar deducciones de lo que sucederá a la temperatura ambiente. (Soler Roger, Rodriguez Perdomo, Pérez Bueno, Riverón Alemán, & Morales Lacarrere, 2011)

De esta manera, se realiza la evaluación de la estabilidad de larga duración o en condiciones aceleradas, por medio de cámaras climatizadas que someten al producto a temperatura y humedad relativa controlada en diferentes rangos de operación. El estudio de larga duración evalúa las características de estabilidad física, química, biológica y microbiológica de un producto bajo las condiciones de almacenamiento sugeridas (temperatura superior a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , y humedad relativa de  $60 \pm 5\%$ ) por doce meses, cubriendo todo el periodo de vida útil o el periodo de reanálisis propuesto. Por otro lado, el estudio de estabilidad acelerado somete al producto a condiciones de almacenamiento extremas (temperatura superior a  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , y humedad relativa de  $75 \pm 5\%$ ) por seis meses, logrando determinar los parámetros cinéticos de los procesos de degradación o predecir la vida útil del producto. Estos estudios son un complemento para los estudios de estabilidad de larga duración. ( Ministerio de la Protección Social)



## 4 Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Evaluar la efectividad microbiológica y estabilidad física de cuatro propuestas de formulación correspondientes a un desinfectante líquido homogéneo, por medio de pruebas de actividad antimicrobiana y ensayos de estabilidad a condiciones aceleradas en producto cerrado.

#### 4.1.1 Objetivos Específicos

1. Caracterizar las materias primas individuales y en mezcla, que se utilizarán en los diferentes prototipos de formulación por medio de calorimetría de barrido diferencial (DSC) para establecer posibles fenómenos de incompatibilidad de ingredientes en las formulaciones.
2. Elaborar cuatro prototipos de formulaciones líquidas homogéneas desinfectantes y evaluar el efecto del ingrediente activo y de cosolvencia, variando algunas materias primas.
3. Realizar un estudio de estabilidad a condiciones aceleradas (Temperatura:  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ , Humedad Relativa:  $75 \pm 5\%$ ) para cada uno de los prototipos elaborados, por medio de análisis de turbidez por espectrofotometría UV.
4. Evaluar la eficacia de los cuatro prototipos elaborados a partir de pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria sobre las bacterias *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, de acuerdo con la Norma Técnica Colombiana 2455 de verificación de eficacia para productos desinfectantes.

## 5 Metodología

### 5.1 Materiales

Las materias primas utilizadas para la preparación de los prototipos fueron: etanol al 70%, agua desionizada, edetato disódico, fragancia de manzana, metilparabeno, propilparabeno, polisorbato 20, color amarillo, propilenglicol y glicerina. El ingrediente activo utilizado fue cloruro de benzalconio. Todas las materias primas fueron proporcionadas por el almacén de la Universidad Icesi. Los envases de polietileno utilizados fueron suministrados por Otorgo envases S.A.S. Los reactivos utilizados para la preparación de los medios de cultivos fueron agar nutritivo, caldo caso y agua tipo II obtenida a partir de un sistema de purificación (Millipore Elix essential, Merck KGaA, Dasmstadt, Germany).

### 5.2 Métodos

#### 5.2.1 Caracterización térmica de las materias primas sólidas

Se realizó la caracterización de las materias primas edetato disódico, color amarillo, metilparabeno y propilparabeno, individual y en mezcla, a partir del equipo DSC Q2000 (DSC; TA Instruments, New Castle, DE, USA) calibrado con indio  $T_f = 155,78^\circ\text{C}$   $\Delta H_f = 28,71 \text{ J/g}$ . Los análisis DSC se llevaron a cabo utilizando tres ciclos de calefacción y refrigeración desde  $-50^\circ$  a  $300^\circ\text{C}$  con una velocidad de calentamiento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ .

#### 5.2.2 Preparación de los cuatro prototipos

Se prepararon los cuatro prototipos del desinfectante líquido homogéneo en envase cerrado por triplicado, las cantidades usadas se encuentran en la tabla 1 para un total de 250mL.

**Tabla 1. Prototipo 1, 2, 3 y 4 de un desinfectante líquido homogéneo**

Prototipo 1			Prototipo 2		
Ingrediente	Cantidad (%)	Función	Ingrediente	Cantidad (%)	Función
Etanol	20	Solvente	Etanol	20	Solvente
Agua desionizada	40,23	Solvente	Agua desionizada	40,53	Solvente
EDTA (edetato disódico)	0,1	Conservante antimicrobiano sinergista	Color amarillo	0,1	Corrector organoléptico
Cloruro de	34	Desinfectante	Cloruro de	34	Desinfectante

benzalconio			benzalconio		
Fragancia	4,7	Corrector organoléptico	Fragancia	4,7	Corrector organoléptico
Metilparabeno	0,12	Conservantes	Metilparabeno	0,12	Conservantes
Propilparabeno	0,15	Conservantes	Propilparabeno	0,15	Conservantes
Polisorbato 20	0,4	Tensoactivo	Polisorbato 20	0,4	Tensoactivo
Color amarillo	0,3	Corrector organoléptico			
<b>Prototipo 3</b>			<b>Prototipo 4</b>		
<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad (%)</b>	<b>Función</b>	<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad (%)</b>	<b>Función</b>
Etanol	20	Solvente	Etanol	20	Solvente
Agua desionizada	25,53	Solvente	Agua desionizada	35	Solvente
Color amarillo	0,1	Corrector organoléptico	Color amarillo	0,1	Corrector organoléptico
Cloruro de benzalconio	34	Desinfectante	Cloruro de benzalconio	34	Desinfectante
Fragancia	4,7	Corrector organoléptico	Fragancia	4,7	Corrector organoléptico
Propilenglicol	15	Agente humectante	Glicerina	5,53	Agente humectante
Metilparabeno	0,12	Conservantes	Metilparabeno	0,12	Conservantes
Propilparabeno	0,15	Conservantes	Propilparabeno	0,15	Conservantes
Polisorbato 20	0,4	Tensoactivo	Polisorbato 20	0,4	Tensoactivo

Inicialmente se mezcló la fragancia con agua desionizada y etanol. Luego se adicionó el color amarillo a la solución anterior. Por otro lado se mezcló el metilparabeno y el propilparabeno en agua a 80-85°C, y se adicionó a la primera solución. Finalmente, se mezcló el cloruro de benzalconio con agua, el polisorbato 20 con el EDTA, propilenglicol y glicerina (según sea el caso) y se añadió a la solución previa.

### 5.2.3 Estudio de estabilidad acelerada

- Se realizó estudio de estabilidad en la cámara climatizada (CAMS, grupo de alianza estratégica para Procaps S.A.) a una temperatura de  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  y Humedad Relativa de  $75 \pm 5\%$ , para cada uno de los prototipos elaborados, en envase cerrado, por triplicado.
- Se realizó análisis físico determinando cambio de estado de agregación a cada prototipo, por medio del espectrofotómetro UV (UV-1800, Shimadzu),

midiendo la absorbancia de cada sistema. Las lecturas se realizaron en la semana cero y en la semana 22 por un periodo de cinco meses.

## **5.2.4 Prueba de concentración mínima inhibitoria**

### **5.2.4.1 Preparación de los medios diluyentes**

- a. Se prepara una solución de buffer de fosfato: pesar 34 g de fosfato monobásico de potasio y disolver en 1L de agua destilada.
- b. Tomar una alícuota de 1,25 ml de la solución anterior y completar volumen con agua destilada en un balón de 1 l.
- c. Preparar caldo tripticasa de soya de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta.
- d. Dispensar 4 ml de caldo de tripticasa de soya en el tubo para cada fila de 12 (12 tubos/muestra/organismo) y 2,4 ml de tripticasa de soya en los tubos restantes, se esteriliza y se deja enfriar.
- e. El agar nutritivo se preparan según las instrucciones de la etiqueta.
- f. Preparar solución de fenol al 5 %
- g. Preparación de KBr-KBrO<sub>3</sub> 0,1N
- h. Estandarización: Se transfieren 30 ml a un erlenmeyer y se adicionan 25 ml de agua, 5 ml de solución KI al 20 % y 5 ml HCl. Se agita suavemente y se titula con tiosulfato de sodio 0,1N usando almidón como indicador.

**Estandarización.** Se estandariza con solución de KBr-KBrO<sub>3</sub> 0,1 N como sigue: se transfieren 25 ml de solución stock de fenol a un balón de 500 ml y se lleva a volumen con agua.

### **5.2.4.2 Preparación de los microorganismos para prueba:**

- a. Todos los organismos deben ser sometidos a un crecimiento en caldo de tripticasa de soya por 24 h a 25 °C.
- b. La turbidez del inóculo debe ser comparado con el tubo No. 1 de la escala de Mac Farland<sup>1</sup> con solución buffer fosfato para luego realizar diluciones hasta 10<sup>-3</sup>.
- c. Preparar las disoluciones: 1 ml del cultivo madre, se lleva a un tubo con 9 ml de solución fosfato buffer; esta es una dilución 10<sup>-1</sup> y así hasta la dilución 10<sup>-3</sup>.

### **5.2.4.3 Diluciones:**

- Colocar una fila de 12 tubos en una gradilla.
- Dispensar 0,4 ml de la solución a analizar en el primer tubo de la fila de 12.
- Mezclar y trasladar 2 ml del primer tubo al segundo.

- Este procedimiento se repite en los tubos restantes.
- Descartar 2 ml del último tubo de la fila.
- Inocular cada tubo con 0,1 ml
- Inocular un tubo control que contenga medio de cultivo.
- Incubar los tubos por 48 horas a 35°C (*Pseudomonas spp* se incuba a 25°C).
- Cada análisis debe hacerse por lo menos por triplicado.

La concentración mínima inhibitoria se expresa en miligramos por litro (mg/L) y el resultado se reporta tomando el tubo inmediatamente anterior al cual hubo crecimiento de microorganismos (realizando la lectura de derecha a izquierda).

### 5.2.5 Matriz de marco lógico

**Tabla 2. Matriz marco lógico**

<b>Objetivo general:</b> Evaluar la efectividad microbiológica y estabilidad física de cuatro propuestas de formulación correspondientes a un desinfectante líquido homogéneo, por medio de pruebas de actividad antimicrobiana y ensayos de estabilidad a condiciones aceleradas en producto cerrado.			
<b>Objetivos específicos</b>	<b>Actividades</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Supuestos</b>
Caracterizar las materias primas individuales y en mezcla, que se utilizarán en los diferentes prototipos de formulación por medio de calorimetría de barrido diferencial (DSC), para establecer posibles fenómenos de incompatibilidad de ingredientes en las formulaciones.	Realizar caracterización de las materias primas individuales y en mezcla a partir de la técnica termo analítica DSC  Recibir capacitación sobre el uso del equipo calorimetría diferencial de barrido (DSC)	Obtención los análisis morfológicos correspondientes a las materias primas seleccionadas.	Disponibilidad de las materias primas  Correcto funcionamiento del equipo.  Suficiente información recolectada y de alto grado de confiabilidad.
Elaborar cuatro prototipos de formulaciones líquidas homogéneas desinfectantes y evaluar el efecto del ingrediente activo y de cosolventes, variando algunas materias primas.	Desarrollar cuatro prototipos de un producto desinfectante líquido  Evaluar la función antimicrobiana del ingrediente funcional	Obtener los cuatro prototipos de un producto desinfectante líquido homogéneo	Disponer de las materias primas necesarias para elaborar los cuatro prototipos

	<p>(cloruro de benzalconio) con la presencia o ausencia del edetato disódico (EDTA)  Evaluar el efecto de cosolvente variando algunos auxiliares de formulación (glicerina y propilenglicol)</p> <p>Realizar el proceso de producción con la metodología adecuada reportada en la literatura.</p>		<p>Disponibilidad de espacios y equipos necesarios para la producción de los cuatro prototipos</p>
<p>Realizar un estudio de estabilidad a condiciones aceleradas (Temperatura: <math>40 \pm 2^{\circ}\text{C}</math>, Humedad Relativa: <math>75 \pm 5\%</math>) para cada uno de los prototipos elaborados, por un tiempo de cinco meses y con una frecuencia de análisis semanal por medio de análisis de turbidez por espectrofotometría UV.</p>	<p>Realizar estudio de estabilidad con cámaras adecuadas para los cuatro prototipos por triplicado</p> <p>Desarrollar el estudio de estabilidad a condiciones aceleradas con una temperatura de <math>40 \pm 2^{\circ}\text{C}</math> y una humedad relativa de <math>75 \pm 5\%</math> durante cinco meses</p> <p>Recibir capacitación sobre el uso de la cámara de estabilidad</p> <p>Recolectar datos sobre la estabilidad física por medio de análisis de turbidez con el espectrofotómetro UV-Vis</p> <p>Realizar la lectura de los resultados al inicio del experimento y a la semana 22</p>	<p>Evaluar la estabilidad física de los cuatro prototipos en condiciones aceleradas por medio de la turbidez durante cinco meses</p>	<p>Disponibilidad de equipos</p> <p>Correcto funcionamiento de los equipos</p> <p>Recolección de datos con alta confiabilidad</p>

<p>Evaluar la eficacia de los cuatro prototipos elaborados a partir de pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria sobre las bacterias <i>Salmonella tiphy</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de acuerdo con la Norma Técnica Colombiana 2455 de verificación de eficacia para productos desinfectantes.</p>	<p>Realizar prueba de concentración mínima inhibitoria con las bacterias <i>Salmonella tiphy</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>Incubar por 24 horas a 25° C en caldo caso los microorganismos a ensayar</p> <p>Desarrollar el procedimiento con 12 tubos contenidos con caldo caso y los cuatro prototipos del desinfectante</p> <p>Inocular cada tubo con la solución que contiene el microorganismo a ensayar</p> <p>Incubar los tubos por 48 horas a 35°C y pasar agar nutritivo por 24 horas</p> <p>Realizar prueba concomitante al estudio de estabilidad con una frecuencia de análisis al inicio del experimento (15 de junio) y al final (15 de noviembre)</p>	<p>Encontrar el prototipo que tenga la concentración mínima inhibitoria menor o igual a la que presenta el fenol al 5%</p>	<p>Obtener las materias primas necesarias para efectuar la prueba de concentración mínima inhibitoria</p> <p>Disponibilidad de equipos y espacios</p> <p>Disponibilidad de las cepas necesarias para la prueba</p> <p>No encontrar el prototipo que tenga la concentración inhibitoria menor a la que presenta el fenol al 5%</p>
---	---	--	---

## 6 Resultados y Discusión

### 6.1 Primer estudio de la efectividad antimicrobiana de los cuatro prototipos

Para esta prueba se preparó la solución estándar según las indicaciones de la Norma Técnica Colombiana 2455, posteriormente se realizó las diluciones establecidas según la norma, teniendo en cuenta las medidas para las buenas prácticas de laboratorio para evitar cualquier tipo de contaminación en las pruebas y generar resultados falsos o inconclusos. Los resultados obtenidos para la solución estándar, fenol al 5% y los cuatro prototipos en el primer análisis de la efectividad son los siguientes:

**Tabla 3. Resultados obtenidos para el fenol 5% en *Salmonella tiphy***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Fenol 5% concentración inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
50000mg/L	5000	2500	1250	625	312,5	156,24	78,13	39,06	19,53	9,76	4,89	2,14
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 4. Resultados obtenidos para el fenol 5% en *Staphylococcus aureus***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Fenol 5% concentración inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
50000mg/L	5000	2500	1250	625	312,5	156,24	78,13	39,06	19,53	9,76	4,89	2,14
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 5. Resultados obtenidos para el fenol 5% en *Pseudomona aeruginosa***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Fenol 5%	Número de tubo											



concentración inicial	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
50000mg/L	5000	2500	1250	625	312,5	156,24	78,13	39,06	19,53	9,76	4,89	2,14
Repetición 1												
Crecimiento	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

El primer tubo de la prueba contiene 3,6mL de caldo caso, se le adicionaron 0,4mL de fenol al 5%, para obtener un volumen final de 4mL, del cual se transfieren 2mL al siguiente tubo que contiene 2mL de caldo caso. Este proceso se repitió con cada tubo conservando el orden correspondiente y descartando 2mL de cada tubo hasta el tubo número 12.

$$\text{Concentración inicial fenol 5\%: } \frac{5g}{100mL} \times \frac{1000mL}{1L} \times \frac{1000mg}{1g} = 50000mg/L$$

De esta manera la concentración del tubo número 1 fue:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

$$0,4mL \times 50000 \frac{mg}{L} = 4mL \times C_2$$

$$C_2 = \frac{0,4mL \times 50000 \frac{mg}{L}}{4mL}$$

$$C_2 = 5000 \frac{mg}{L}$$

## 6.2 Estudio de la efectividad de los cuatro prototipos a tiempo cero

Para el ensayo de los cuatro prototipos del desinfectante líquido, los cuales contienen como ingrediente activo el Cloruro de Benzalconio en un porcentaje de 34% en la formulación para un volumen total de 250mL, se obtiene la concentración del ingrediente activo a partir de la densidad reportada en la literatura como 0,98g/mL.

Volumen del Cloruro de Benzalconio en la formulación: 34% × 250mL = 85mL

Masa del Cloruro de Benzalconio en la formulación: 0,98g/mL × 85mL = 83,3g

$$83,3g \times \frac{1000mg}{1g} = 83300mg \text{ de Cloruro de Benzalconio}$$

Concentración inicial del Cloruro de Benzalconio en los cuatro prototipos:

$$\frac{83300mg}{250mL} \times \frac{1000mL}{1L} = 333200mg/L$$

El primer tubo contiene 3,6mL de caldo caso, al cual se le adicionaron 0,4mL del prototipo respectivo para completar un volumen de 4mL, del cual se transfirieron 2mL al siguiente tubo. Este proceso se repitió con cada tubo según la norma conservando el orden correspondiente y se descartaron 2mL de cada tubo hasta el tubo número 12. De esta manera la concentración del desinfectante en el tubo número 1 fue:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$0,4mL \times 333200 \frac{mg}{L} = 4mL \times C_2$$

$$C_2 = \frac{0,4mL \times 333200 \frac{mg}{L}}{4mL}$$

$$C_2 = 33320 \frac{mg}{L}$$

## 6.2.1 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para el Prototipo 1

**Tabla 6. Resultados obtenidos para el Prototipo 1 en *Salmonella tiphy***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 1 concentración inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/L	33320	16660	8330	4165	2082,5	1041,25	520,62	260,31	130,15	65,07	32,53	16,26
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 7. Resultados obtenidos para el Prototipo 1 en *Staphylococcus aureus***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 1 concentración inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/L	33320	16660	8330	4165	2082,5	1041,25	520,62	260,31	130,15	65,07	32,53	16,26

Repetición 1													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Repetición 2													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Repetición 3													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 8. Resultados obtenidos para el Prototipo 1 en *Pseudomona aeruginosa***

Concentración Mínima Inhibitoria													
Prototipo 1 concentración inicial	Número de tubo												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
333200mg/L	33320	16660	8330	4165	2082,5	1041,25	520,62	260,31	130,15	65,07	32,53	16,26	
Repetición 1													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Repetición 2													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Repetición 3													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

### 6.2.2 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para el Prototipo 2

**Tabla 9. Resultados obtenidos para el Prototipo 2 en *Salmonella tiphy***

Concentración Mínima Inhibitoria													
Prototipo 2 concentración inicial	Número de tubo												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
333200mg/L	33320	16660	8330	4165	2082,5	1041,25	520,62	260,31	130,15	65,07	32,53	16,26	
Repetición 1													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Repetición 2													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Repetición 3													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 10. Resultados obtenidos para el Prototipo 2 en *Staphylococcus aureus***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 2 concentración inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/L	33320	16660	8330	4165	2082,5	1041,25	520,62	260,31	130,15	65,07	32,53	16,26
Repetición 1												

Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 11. Resultados obtenidos para el Prototipo 2 en *Pseudomona aeruginosa***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 2 concentración inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/L	33320	16660	8330	4165	2082,5	1041,25	520,62	260,31	130,15	65,07	32,53	16,26
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

### 6.2.3 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para el Prototipo 3

**Tabla 12. Resultados obtenidos para el Prototipo 3 en *Salmonella tiphy***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 3 concentración inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/L	33320	16660	8330	4165	2082,5	1041,25	520,62	260,31	130,15	65,07	32,53	16,26
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 13. Resultados obtenidos para el Prototipo 3 en *Staphylococcus aureus***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 3 concentración inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/L	33320	16660	8330	4165	2082,5	1041,25	520,62	260,31	130,15	65,07	32,53	16,26
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Repetición 2													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Repetición 3													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 14. Resultados obtenidos para el Prototipo 3 en *Pseudomona aeruginosa***

Concentración Mínima Inhibitoria													
Prototipo 3 concentración inicial	Número de tubo												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
333200mg/L	33320	16660	8330	4165	2082,5	1041,25	520,62	260,31	130,15	65,07	32,53	16,26	
Repetición 1													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Repetición 2													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Repetición 3													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

#### 6.2.4 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para el Prototipo 4

**Tabla 15. Resultados obtenidos para el Prototipo 4 en *Salmonella tiphy***

Concentración Mínima Inhibitoria													
Prototipo 4 concentración inicial	Número de tubo												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
333200mg/L	33320	16660	8330	4165	2082,5	1041,25	520,62	260,31	130,15	65,07	32,53	16,26	
Repetición 1													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Repetición 2													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Repetición 3													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 16. Resultados obtenidos para el Prototipo 4 en *Staphylococcus aureus***

Concentración Mínima Inhibitoria													
Prototipo 4 concentración inicial	Número de tubo												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
333200mg/L	33320	16660	8330	4165	2082,5	1041,25	520,62	260,31	130,15	65,07	32,53	16,26	
Repetición 1													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Repetición 2													

Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Repetición 3													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 17. Resultados obtenidos para el Prototipo 4 en *Pseudomona aeruginosa***

Prototipo 4 concentración inicial	Concentración Mínima Inhibitoria												
	Número de tubo												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
333200mg/L	33320	16660	8330	4165	2082,5	1041,25	520,62	260,31	130,15	65,07	32,53	16,26	
Repetición 1													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Repetición 2													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Repetición 3													
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

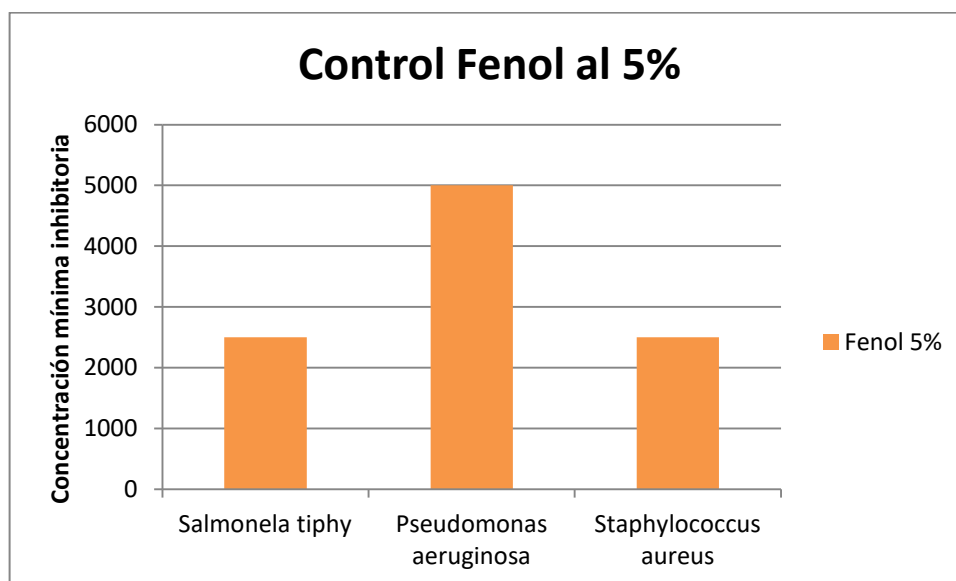
La primera prueba de Concentración Mínima Inhibitoria para la evaluación de la efectividad cumple para los cuatro prototipos del desinfectante líquido homogéneo en las tres bacterias estudiadas, ya que para la prueba con *Salmonella tiphy*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, el fenol al 5% inhibió el crecimiento a una concentración de 2500mg/L, 2500mg/L y 5000mg/L respectivamente, mientras que el prototipo 1 inhibió este crecimiento a las concentraciones de 130,15mg/L, 130,15mg/L y 32,53mg/L respectivamente, el prototipo 2 inhibió este crecimiento a las concentraciones de 65,07mg/L, 65,07mg/L y 130,15mg/L respectivamente, prototipo 3 inhibió este crecimiento a las concentraciones de 130,15mg/L, 65,07mg/L y 260,31mg/L respectivamente, finalmente prototipo 4 inhibió este crecimiento a las concentraciones de 65,07mg/L, 65,07mg/L y 130,15mg/L respectivamente. La Norma Técnica Colombiana 2455 indica que la concentración de los cuatro prototipos del desinfectante estudiado debe ser menor a la Concentración Mínima Inhibitoria del Fenol al 5%.

**Tabla 18. Resultados finales de la Concentración Mínima Inhibitoria para el primer análisis de la efectividad**

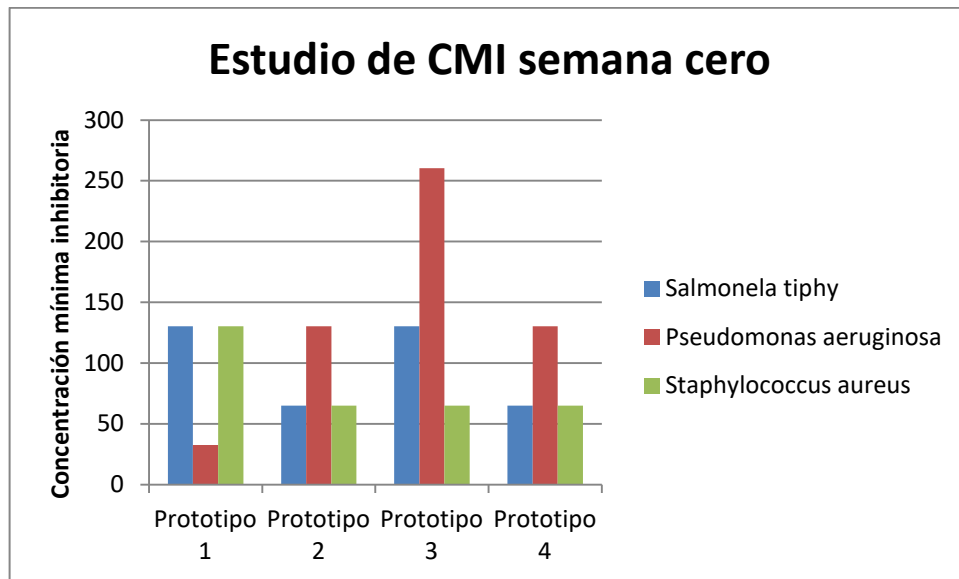
Desinfectante	Microorganismo	Concentración Mínima Inhibitoria (mg/L)
Fenol 5%	<i>Salmonella tiphy</i>	2500
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2500
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	5000
Prototipo 1	<i>Salmonella tiphy</i>	130,15
	<i>Staphylococcus aureus</i>	130,15

	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	32,53
<b>Prototipo 2</b>	<i>Salmonella tiphy</i>	65,07
	<i>Staphylococcus aureus</i>	65,07
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	130,15
<b>Prototipo 3</b>	<i>Salmonella tiphy</i>	130,15
	<i>Staphylococcus aureus</i>	65,07
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	260,31
<b>Prototipo 4</b>	<i>Salmonella tiphy</i>	65,07
	<i>Staphylococcus aureus</i>	65,07
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	130,15

A continuación se presentan los resultados de la concentración mínima inhibitoria en un grafico de columnas donde se puede hacer la comparación de la efectividad antimicrobiana de los cuatro prototipos frente al control el fenol al 5%.



**Gráfica 1. CMI del fenol al 5%**

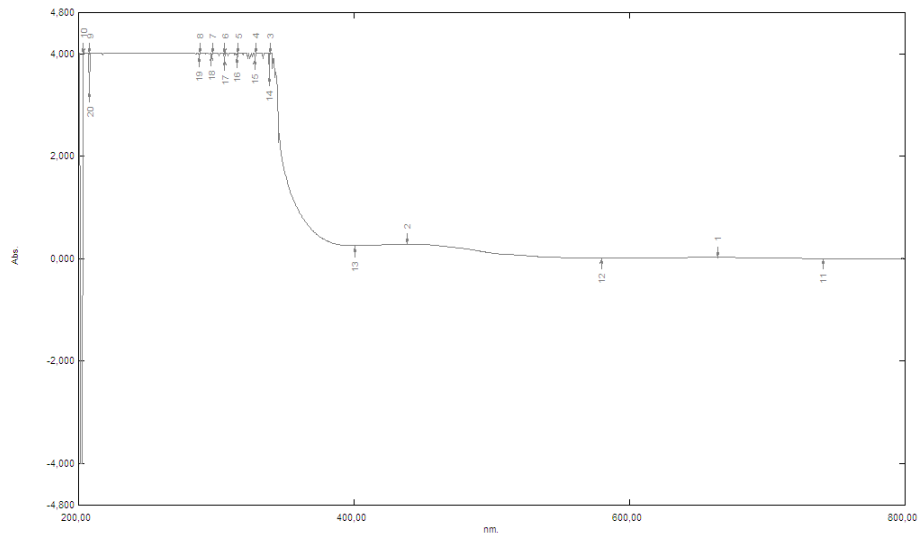


**Gráfica 2. CMI de los cuatro prototipos en la semana cero**

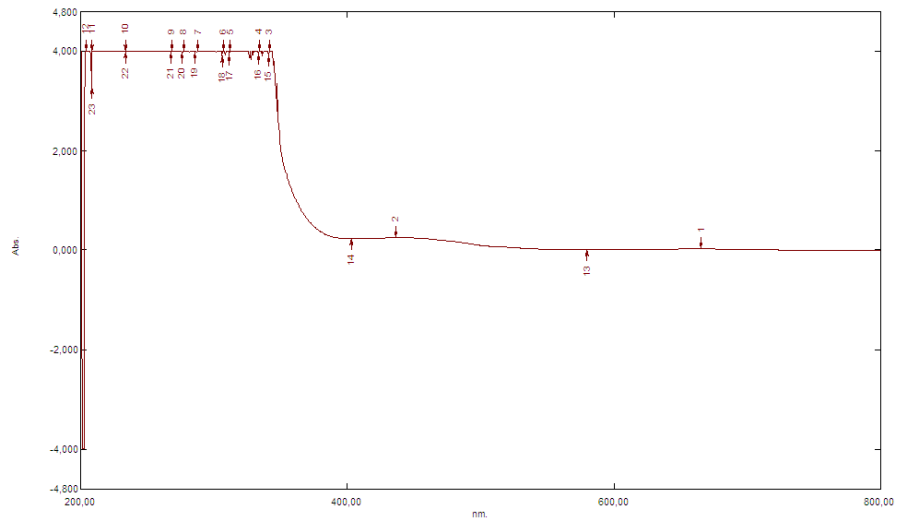
#### 6.2.5 Absorbancia Prototipos semana cero

Para poder evaluar la estabilidad física de los cuatro prototipos se realizó una inspección visual para identificar la posible aparición de precipitado o partículas en el producto (cambios en su estado de agregación), para esto se midió la absorbancia a partir de un barrido con una longitud de onda de 200 a 800nm, región correspondiente al espectro visible, otro método que se pudo haber utilizado para la identificación de posibles partículas en los prototipos pudo ser la evaluación de tamaño de partícula, partir de herramientas como la microscopia óptica. Los resultados se encuentran a continuación para la semana cero.

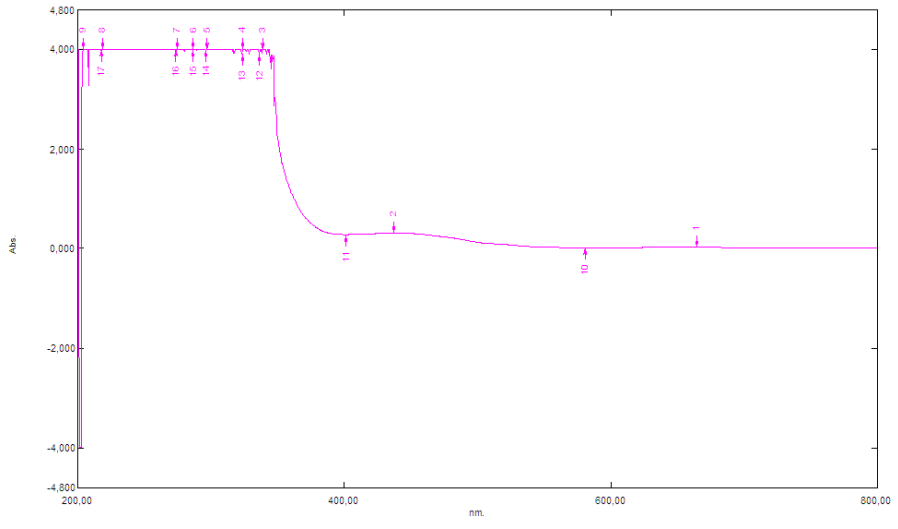




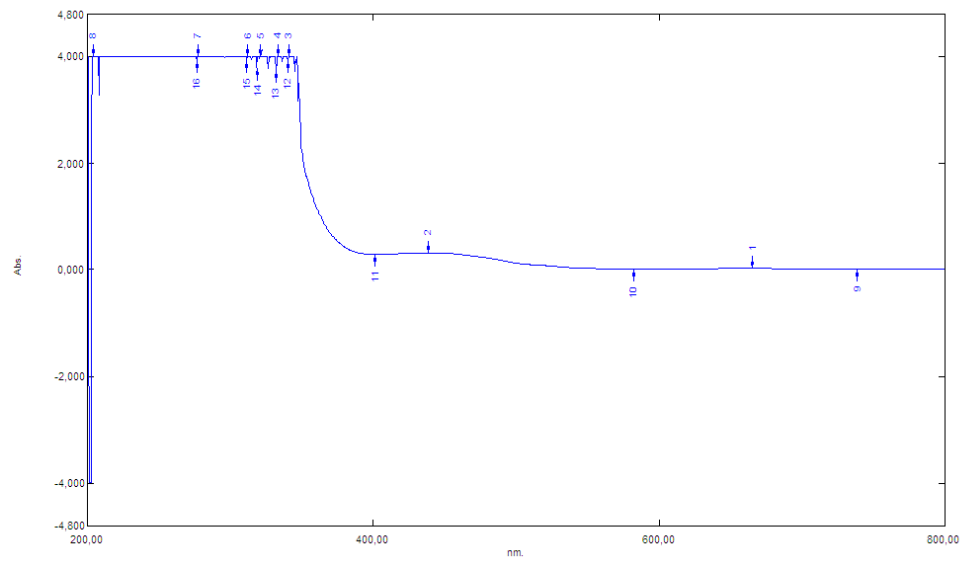
**Figura 2. Espectro de Absorbancia Prototipo 1**



**Figura 3. Espectro de Absorbancia Prototipo 2**



**Figura 4. Espectro de Absorbancia Prototipo 3**



**Figura 5. Espectro de Absorbancia Prototipo 4**

### 6.3 Segundo estudio de la efectividad antimicrobiana de los cuatro prototipos

#### 6.3.1 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para el Prototipo 1

**Tabla 19. Resultados obtenidos para el Prototipo 1 en *Salmonella tiph***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 1 concentración inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/L	33320	16660	8330	4165	2082,5	1041,25	520,62	260,31	130,15	65,07	32,53	16,26
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 20. Resultados obtenidos para el Prototipo 1 en *Staphylococcus aureus***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 1 concentración inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/L	33320	16660	8330	4165	2082,5	1041,25	520,62	260,31	130,15	65,07	32,53	16,26
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 21. Resultados obtenidos para el Prototipo 1 en *Pseudomona aeruginosa***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 1 concentración inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/L	33320	16660	8330	4165	2082,5	1041,25	520,62	260,31	130,15	65,07	32,53	16,26
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Repetición 3												

Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
-------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

### 6.3.2 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para el Prototipo 2

**Tabla 22. Resultados obtenidos para el Prototipo 2 en *Salmonella tiphy***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 2 concentraci ón inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/ L	3332 0	1666 0	833 0	416 5	2082, 5	1041,2 5	520,6 2	260,3 1	130,1 5	65,0 7	32,5 3	16,2 6
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 23. Resultados obtenidos para el Prototipo 2 en *Staphylococcus aureus***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 2 concentraci ón inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/ L	3332 0	1666 0	833 0	416 5	2082, 5	1041,2 5	520,6 2	260,3 1	130,1 5	65,0 7	32,5 3	16,2 6
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 24. Resultados obtenidos para el Prototipo 2 en *Pseudomona aeruginosa***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 2 concentraci ón inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/ L	3332 0	1666 0	833 0	416 5	2082, 5	1041,2 5	520,6 2	260,3 1	130,1 5	65,0 7	32,5 3	16,2 6
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

### 6.3.3 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para el Prototipo 3

**Tabla 25. Resultados obtenidos para el Prototipo 3 en *Salmonella tiphy***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 3 concentraci ón inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/ L	3332 0	1666 0	833 0	416 5	2082, 5	1041,2 5	520,6 2	260,3 1	130,1 5	65,0 7	32,5 3	16,2 6
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 26. Resultados obtenidos para el Prototipo 3 en *Staphylococcus aureus***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 3 concentraci ón inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/ L	3332 0	1666 0	833 0	416 5	2082, 5	1041,2 5	520,6 2	260,3 1	130,1 5	65,0 7	32,5 3	16,2 6
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 27. Resultados obtenidos para el Prototipo 3 en *Pseudomona aeruginosa***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 3 concentraci ón inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/ L	3332 0	1666 0	833 0	416 5	2082, 5	1041,2 5	520,6 2	260,3 1	130,1 5	65,0 7	32,5 3	16,2 6
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

### 6.3.4 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria para el Prototipo 4

**Tabla 28. Resultados obtenidos para el Prototipo 4 en *Salmonella tiph***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 4 concentraci ón inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/ L	3332 0	1666 0	833 0	416 5	2082, 5	1041,2 5	520,6 2	260,3 1	130,1 5	65,0 7	32,5 3	16,2 6
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 29. Resultados obtenidos para el Prototipo 4 en *Staphylococcus aureus***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 4 concentraci ón inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/ L	3332 0	1666 0	833 0	416 5	2082, 5	1041,2 5	520,6 2	260,3 1	130,1 5	65,0 7	32,5 3	16,2 6
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

**Tabla 30. Resultados obtenidos para el Prototipo 4 en *Pseudomona aeruginosa***

Concentración Mínima Inhibitoria												
Prototipo 4 concentraci ón inicial	Número de tubo											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
333200mg/ L	3332 0	1666 0	833 0	416 5	2082, 5	1041,2 5	520,6 2	260,3 1	130,1 5	65,0 7	32,5 3	16,2 6
Repetición 1												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Repetición 2												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Repetición 3												
Crecimiento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

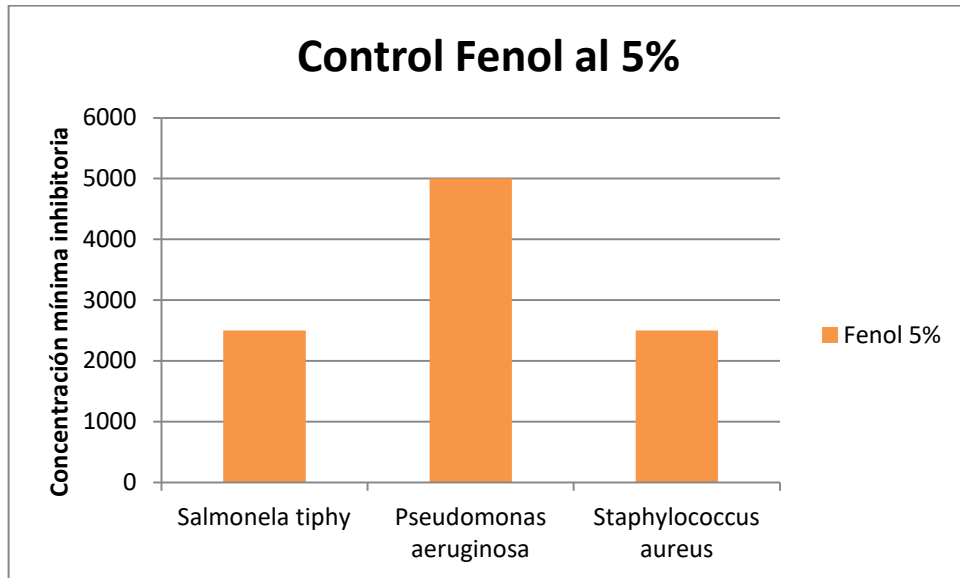
Nota: presenta crecimiento bacteriano (+) no presenta crecimiento bacteriano (-)

La segunda prueba de Concentración Mínima Inhibitoria realizada cinco meses después de exponer los cuatro prototipos a unas condiciones de estrés para evaluar la efectividad, cumple para los cuatro prototipos del desinfectante líquido homogéneo en las tres bacterias estudiadas, ya que para la prueba con *Salmonella tiphy*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, el fenol al 5% inhibió el crecimiento a una concentración de 2500mg/L, 2500mg/L y 5000mg/L respectivamente, mientras que el prototipo 1 inhibió este crecimiento a las concentraciones de 32,53mg/L, 65,07mg/L y 130,15mg/L respectivamente, el prototipo 2 inhibió este crecimiento a las concentraciones de 130,15mg/L, 32,53mg/L y 260,31mg/L respectivamente, prototipo 3 inhibió este crecimiento a las concentraciones de 65,07mg/L, 65,07mg/L y 260,31mg/L respectivamente, finalmente prototipo 4 inhibió este crecimiento a las concentraciones de 65,07mg/L, 32,53mg/L y 130,15mg/L respectivamente. La Norma Técnica Colombiana 2455 indica que la concentración de los cuatro prototipos del desinfectante estudiado debe ser menor a la Concentración Mínima Inhibitoria del Fenol al 5%.

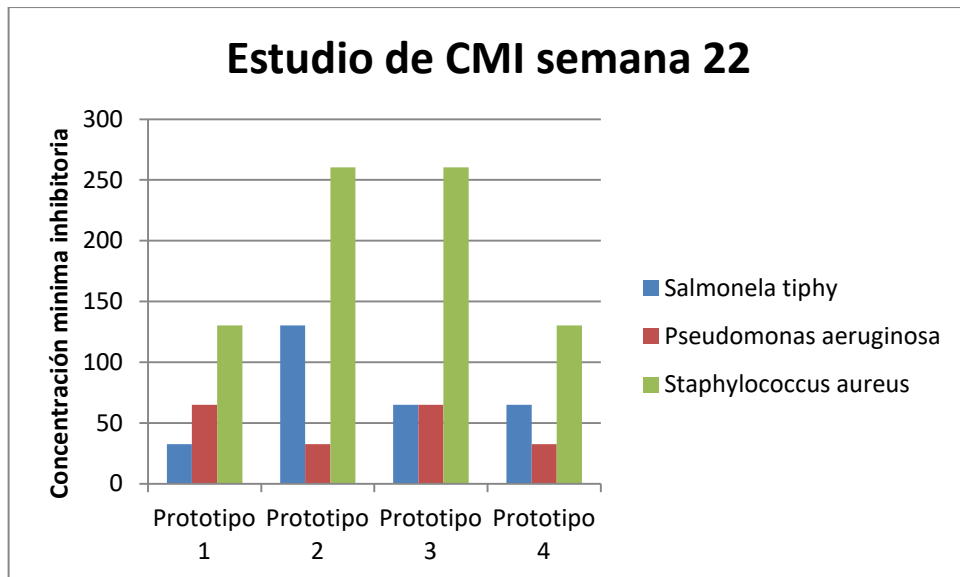
**Tabla 31. Resultados finales de la Concentración Mínima Inhibitoria para el segundo análisis de la efectividad**

<b>Desinfectante</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Concentración Mínima Inhibitoria (mg/L)</b>
<b>Fenol 5%</b>	<i>Salmonella tiphy</i>	2500
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2500
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	5000
<b>Prototipo 1</b>	<i>Salmonella tiphy</i>	32,53
	<i>Staphylococcus aureus</i>	65,07
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	130,15
<b>Prototipo 2</b>	<i>Salmonella tiphy</i>	130,15
	<i>Staphylococcus aureus</i>	32,53
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	260,31
<b>Prototipo 3</b>	<i>Salmonella tiphy</i>	65,07
	<i>Staphylococcus aureus</i>	65,07
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	260,31
<b>Prototipo 4</b>	<i>Salmonella tiphy</i>	65,07
	<i>Staphylococcus aureus</i>	32,53
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	130,15

A continuación se presentan los resultados de la concentración mínima inhibitoria en la semana veintidós en un grafico de columnas donde se puede hacer la comparación de la efectividad antimicrobiana de los cuatro prototipos frente al control el fenol al 5%.



**Gráfica 3. CMI del fenol al 5%**

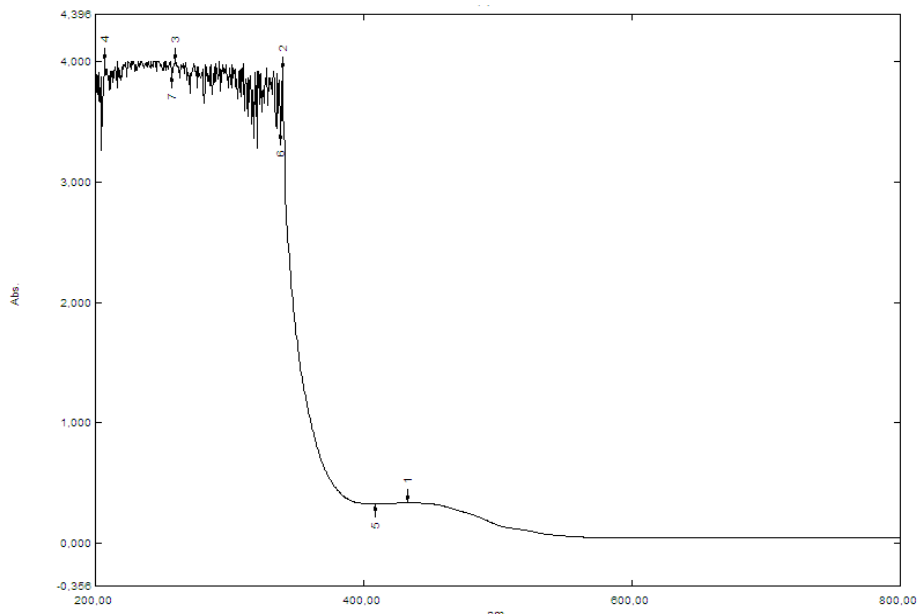


**Gráfica 4. CMI para los cuatro prototipos en la semana 22**

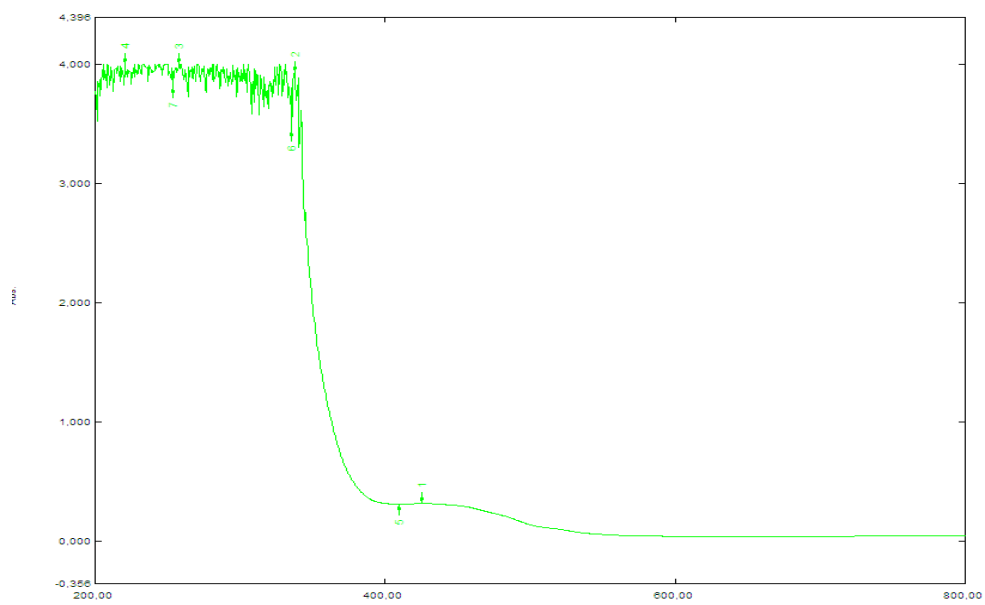


#### 6.4 Absorbancia Prototipos semana veintidós

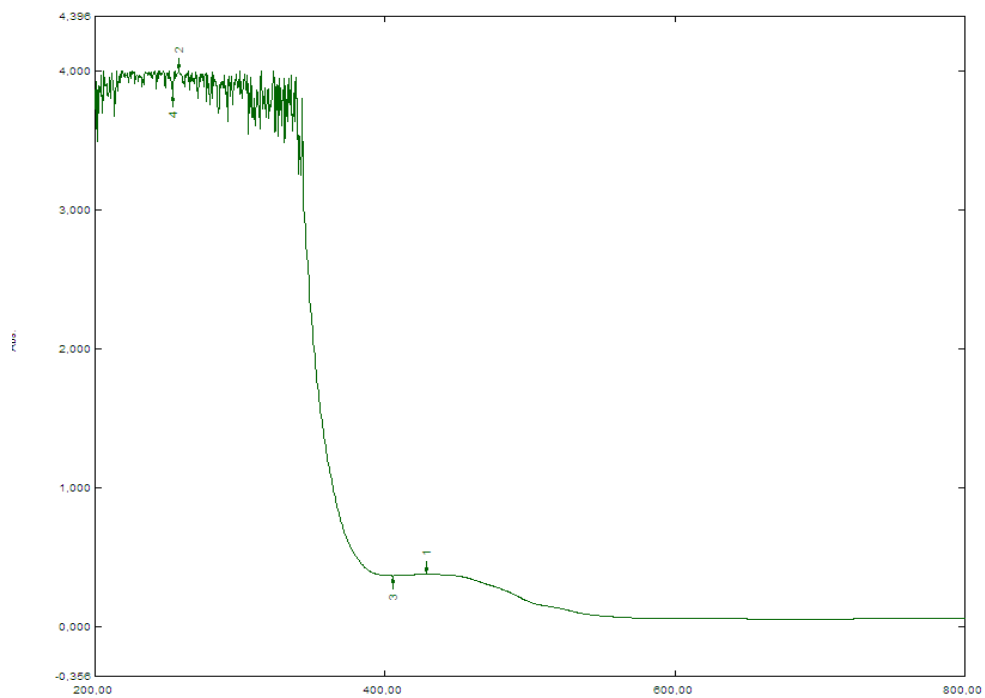
Luego de veintidós semanas donde los cuatro prototipos estuvieron expuestos a condiciones de estrés, se midió la absorbancia para identificar posibles cambios físicos, a partir de un barrido con una longitud de onda de 200 a 800nm, región correspondiente al espectro visible. Los resultados se encuentran a continuación.



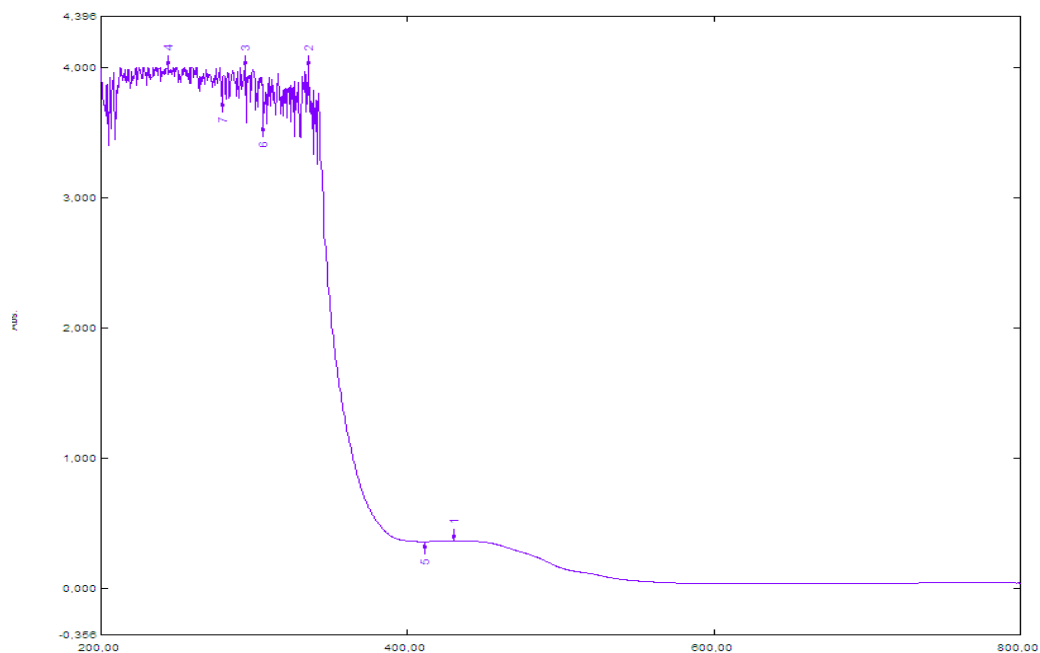
**Figura 6. Espectro de Absorbancia Prototipo 1**



**Figura 7. Espectro de Absorbancia Prototipo 2**



**Figura 8. Espectro de Absorbancia Prototipo 3**



**Figura 9. Espectro de Absorbancia Prototipo 4**

Este estudio de estabilidad física realizado a los cuatro prototipos del desinfectante líquido, se desarrollaron dos análisis durante todos los cinco meses correspondientes al estudio, semana cero (15 de junio), y semana 22 (15 de noviembre). Los cuatro prototipos estuvieron expuestos durante cinco meses (15 de junio al 15 de noviembre), a una temperatura de 40°C y a una humedad relativa de 75%. El análisis físico se realizó por medio del espectrofotómetro UV, donde se obtuvieron picos de Absorbancia en la zona del espectro visible, es decir, longitudes de onda desde 400 a 700 nm, estos resultados se deben al color amarillo presente en los prototipos, los colores del espectro visible son violeta (380-450 nm), azul (450-495 nm), verde (495-570 nm), amarillo (570-590 nm), anaranjado (590-620 nm) y rojo (620-750 nm). De esta manera el análisis físico realizado por triplicado a los cuatro prototipos arrojaron las mismas absorbancias en los dos análisis realizados durante todo el estudio, evidenciando la no aparición de partículas o cambios físicos.

### **6.5 Caracterización de las materias primas por calorimetría diferencial de barrido**

La caracterización de las materias primas individual y en mezcla se realizó por medio del equipo DSC para las materias primas sólidas presentes en la formulación de los cuatro prototipos, estas fueron: color amarillo, edetato disódico,



pico endotérmico en la curva de DSC. De esta manera la calorimetría diferencial de barrido es capaz de medir la cantidad de calor absorbido o eliminado durante las transiciones. Por lo tanto los resultados obtenidos para cada materia prima fueron su temperatura de fusión y la cantidad de calor suministrado para alcanzar esa transición, las cuales fueron 189,07°C, 254,38°C, 127,46°C y 97,85°C para el color amarillo, edetato disódico, metilparabeno y propilparabeno respectivamente.

Posteriormente se realizó la evaluación de las temperaturas de fusión con las materias primas en mezcla con y sin el EDTA, para determinar si existe algún tipo de incompatibilidad, aparición de eventos térmicos o solapamientos. Los resultados obtenidos mostraron las transiciones de cada una de las materias primas, donde sus temperaturas de fusión aumentan o disminuyen según la mezcla. Posteriormente se realizó una comparación entre todos los termogramas evaluados para determinar si la presencia de algún pico desaparece en las mezclas evaluadas, obteniéndose disminución de intensidad en las señales térmicas para los parabenos en la mezcla de sólidos, esta disminución en la magnitud de su flujo calórico se deben a las interacciones que presenta cada componente, esto se puede expresar por las fuerzas intermoleculares afectas por la energía cohesiva o la energía necesaria para separar a las moléculas en su estado de agregación, otra característica que puede afectar los resultados de los flujos calóricos son la rigidez o flexibilidad de las cadenas presentes en la estructura química de cada materia prima, dependiendo de ésta de la mayor o menor facilidad para la rotación alrededor de los enlaces covalentes de la cadena o de las interacciones intermoleculares de Van der Waals o enlaces de hidrogeno que se puedan presentar entre estas a la hora de facilitar la interacción de cada uno de ellas al mezclarse.

En cuanto a los resultados obtenidos para la evaluación de la efectividad antimicrobiana para cada prototipo según la Norma Técnica Colombiana 2455 la concentración mínima de inhibición de los prototipos del desinfectante evaluado debe ser menor o igual a la del Fenol al 5%, es decir que las concentraciones obtenidas por los cuatro prototipos no deben ser mayor a 5000mg/L para *Pseudomona aeruginosa*, 2500mg/L para *Salmonella tiphy* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados de esta prueba demostraron que la concentración del ingrediente activo presente en los cuatro prototipos es la correcta ya que cumple con la prueba en los tres microorganismos.

En esta prueba la forma de determinar el crecimiento de los microorganismos se realizó mediante la siembra en cajas petri con agar nutritivo de cada muestra, las cuales se dejan incubando por 24 horas, si se presenta crecimiento, se debe a la presencia de microorganismos en la concentración diluida de cada prototipo del desinfectante líquido. Sin embargo para poder obtener resultados confiables de esta prueba, se recomienda realizar el ensayo por triplicado y tener buenas prácticas de laboratorio al momento de realizar la prueba, ya que cualquier técnica errónea que se cometa durante el proceso puede provocar contaminación

indeseada que afectará los resultados, dando resultados falsos o inconclusos en este análisis.

El análisis de la Concentración Mínima Inhibitoria se realizó simultáneamente con estudio de estabilidad acelerada durante cinco meses, por lo que se evaluó la efectividad de los cuatro prototipos en el tiempo cero y en el tiempo final, para poder comparar si el poder desinfectante se vio afectado por las condiciones de almacenamiento extremas (temperatura superior a  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ , y humedad relativa de  $75 \pm 5\%$ ). De esta manera se logra evaluar el agente desinfectante activo contra una amplia gama de bacterias, levaduras y hongos, a base de un amonio cuaternario usado ampliamente para la desinfección en baños, laboratorios, colegios, hoteles, entre otros. Las características físicas de los cuatro prototipos se basan en un líquido homogéneo de color amarillo, con olor a manzana, pH neutro (pH=7), y sin partículas extrañas.

Cada prototipo tiene una variación en sus ingredientes con el fin de evaluar su efectividad antimicrobiana, para el prototipo 1 se adiciona el edetato disódico para mejorar la actividad antimicrobiana del Cloruro de benzalconio frente a cepas de *Pseudomonas*, ya que este es ineficaz contra algunas cepas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Trichophyton interdigitale*, y *T.rubrum*. Sin embargo, en combinación con edetato disódico (0,01 hasta 0,1%), alcohol bencílico, feniletanol o fenilpropanol, se aumenta la actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Por lo anterior se pudo comprobar el efecto sinergista antimicrobiano del Edetato disódico con el Cloruro de benzalconio al obtener los primeros resultados (tiempo cero) de la CMI para el prototipo 1, el cual fue el que obtuvo la concentración mínima inhibitoria para *Pseudomonas aeruginosa* de 32,53mg/L, mientras que para los prototipos 2, 3 y 4 fueron de 130,15mg/L, 260,31mg/L y 130,15mg/L respectivamente. Por otro lado los resultados obtenidos de la CMI para *Pseudomonas aeruginosa* para el prototipo 1 luego del estudio de estabilidad, fue de 130,15mg/L, mientras que para los prototipos 2, 3 y 4 fueron de 260,31mg/L, lo cual indica que el efecto sinergista entre el ingrediente activo y el edetato disódico sigue siendo efectivo para esta bacteria luego de haber sido sometido a condiciones extremas de temperatura y humedad por cinco meses.

Cabe resaltar que la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) debe ser realizada por las empresas que realizan productos sanitizantes, esterilizantes, desinfectantes y esporicidas, ya que con ello se garantiza la seguridad y eficacia de los productos, antes de su venta y distribución.

## 7 Conclusiones

1. Los cuatro prototipos del desinfectante líquido realizados mostraron ser efectivos para inhibir el crecimiento de unidades formadoras de colonias en *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella tiphy* y *Staphylococcus aureus*.
2. Los resultados de las concentraciones de los cuatro prototipos antes y después del estudio de estabilidad cumplen con la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria descrita en la Norma Técnica 2455.
3. Los resultados de las materias primas en mezcla e individual a partir de la técnica termoanalítica calorimetría diferencial de barrido presentan cambios en la intensidad de las señales térmicas cuando estas se encuentran en mezcla.
4. El efecto sinérgico entre el ingrediente activo, cloruro de benzalconio y el edetato disódico mostro una mayor inhibición en el crecimiento de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* en comparación con los otros prototipos.
5. La estabilidad física de los cuatro prototipos se mantuvo durante el estudio a condiciones de estrés por cinco meses.
6. No es posible determinar la verdadera estabilidad de los cuatro prototipos, debido a que para poder llegar a esta conclusión se requiere de otro análisis durante todo el estudio.

## 8 Recomendaciones

Se recomienda realizar el estudio de concentración mínima inhibitoria con el microorganismo *Bacillus subtilis*, especificado en la norma. Ya que no fue posible contar con este microorganismo para la realización del proyecto.

Es necesario realizar la caracterización de todas las materias primas utilizadas en la formulación de los cuatro prototipos, ya que solo se conto con el análisis de las materias primas sólidas, mas no con las materias primas liquidas, las cuales conforman el mayor porcentaje de la formulación.

Desarrollar un estudio de desempeño más exhaustivo debido a la variabilidad de los resultados obtenidos en la Concentración Mínima Inhibitoria de los cuatro prototipos en la semana cero y en la semana veintidós.



## 9 Bibliografía

Ministerio de la Protección Social. (s.f.). *DOCUMENTO TPECNICO GUÍA DE ESTABILIDAD DE MEDICAMENTOS*. Recuperado el 1 de Mayo de 2016, de <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/GU%C3%8DA%20PARA%20EL%20DESARROLLO%20Y%20PRESENTACI%C3%93N%20DE%20LOS%20ESTUDIOS%20DE%20ESTABILIDAD%20DE%20MEDICAMENTOS%20CONVENCIONALES.pdf>

2006, R. d. (30 de Diciembre de 2005). *Decreto 4741 de 2005*. Recuperado el 27 de Abril de 2016, de <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=18718>

2455, N. T. (2000). *Desinfectantes. Limpiadores líquidos. Desinfectantes para uso doméstico*. Bogotá: ICONTEC.

Bosquet, L. G. (11 de Agosto de 2015). *Antisépticos y desinfectantes*. Recuperado el 25 de Noviembre de 2016, de [http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?\\_f=10&pident\\_articulo=13044452&pident\\_usuario=0&pident\\_revista=4&fichero=4v22n03a13044452pdf001.pdf&ty=59&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13044452&pident_usuario=0&pident_revista=4&fichero=4v22n03a13044452pdf001.pdf&ty=59&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es)

Cabrera, C. E., Gómez, R. F., & Zúñiga, A. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica* .

course, S. i. (2011-2012). *Tratamiento y eliminación de residuos químicos en el trabajo diario del laboratorio*. Recuperado el 27 de Abril de 2016, de NOP: [http://www.oc-praktikum.de/nop/es/articles/pdf/WasteTreatmentDisposal\\_es.pdf](http://www.oc-praktikum.de/nop/es/articles/pdf/WasteTreatmentDisposal_es.pdf)

Hoyos Serrano, M. (2014). Esterilización, desinfección, antisepticos y desinfectantes. *Revista de Actualización Clínica Investiga* .

J. Rueda, J. A. (2003). Evaluación de desinfectantes de amonio cuaternario sobre cepas de origen animal. *Sci, Tech. Off. int. Epiz.* , 1098-1099.

Kahrs, R. (1995). *Principios generales de la desinfección*. Recuperado el 25 de Noviembre de 2016, de <http://www.oie.int/doc/ged/D8972.PDF>

M., M. (2015). Cleaning and disinfecting enviromental surfaces in health care. *American Journal of Infection Control* , 424-434.

Rodríguez Pérez, A. U. (2006). La desinfección-antisepsia y esterilización en la antencion primaria de salud. *Revista Cubana de Medicina Genral Integral* .

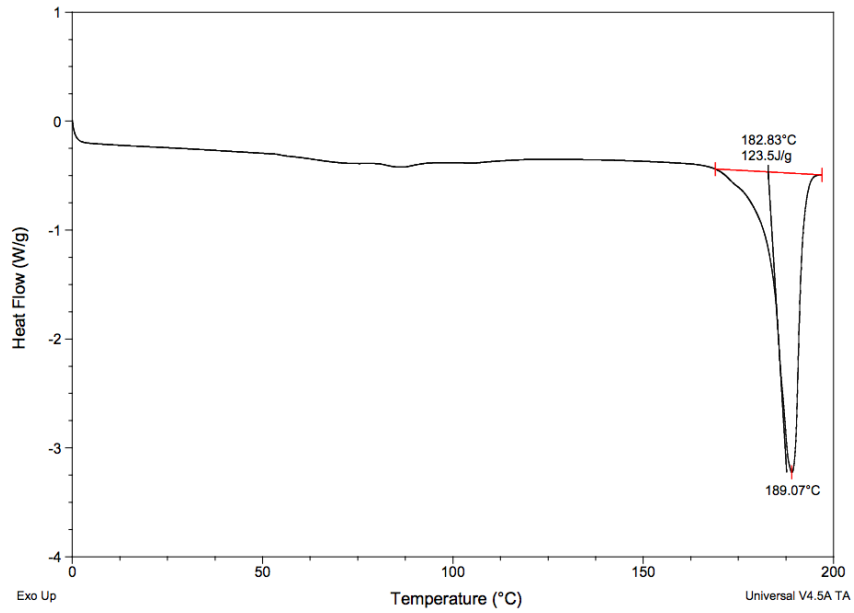
Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Quinn, M. E. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. USA: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association 2009.

Sanchez, L., & Saenz, E. (2005). *Antisépticos y desinfectantes*. Recuperado el 25 de Noviembre de 2016, de Educación medica continua: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v15\\_n2/pdf/a02.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v15_n2/pdf/a02.pdf)

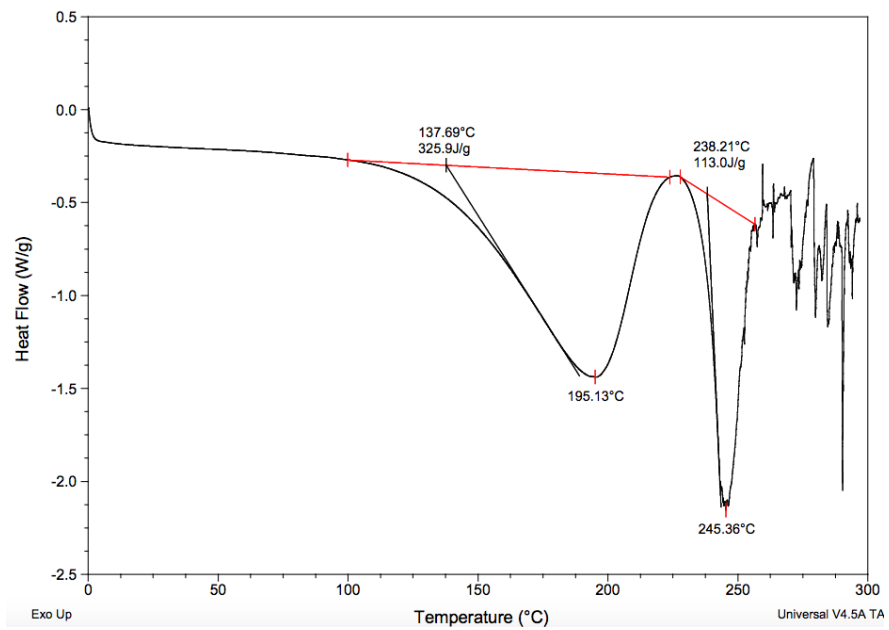
Soler Roger, D. M., Rodriguez Perdomo, Y., Pérez Bueno, T., Riverón Alemán, Y., & Morales Lacarrere, I. G. (2011). Estabilidad acelerada de un gel de *Rhizophora mangle* L. para heridas y quemaduras. *Revista Cubana de Farmacia* , 563-566.

Villar Aguirre, M. (Diciembre de 2011). *Factores determinantes de la salud: Importancia de la prevención*. Recuperado el 20 de Abril de 2016, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1728-59172011000400011&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1728-59172011000400011&script=sci_arttext)

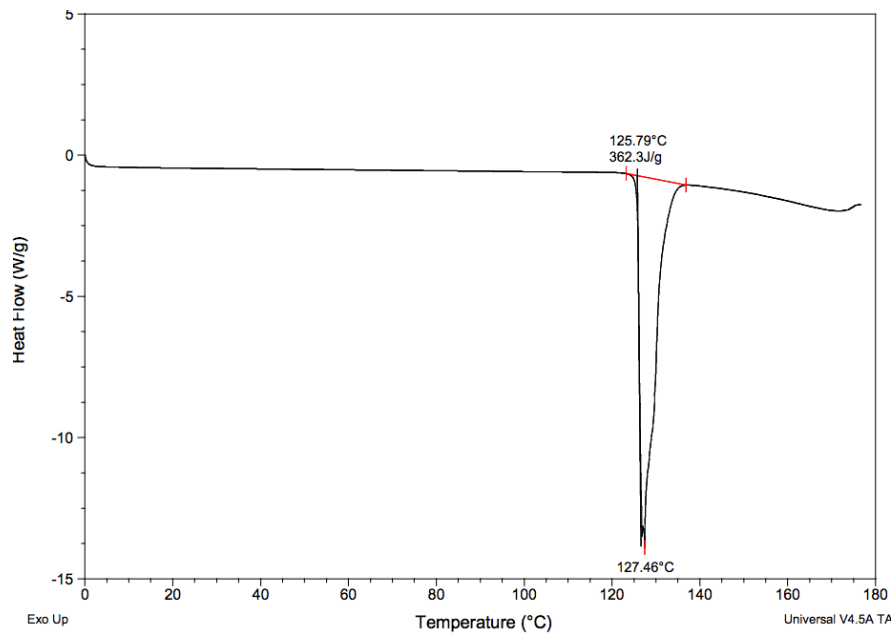
## a. Anexos



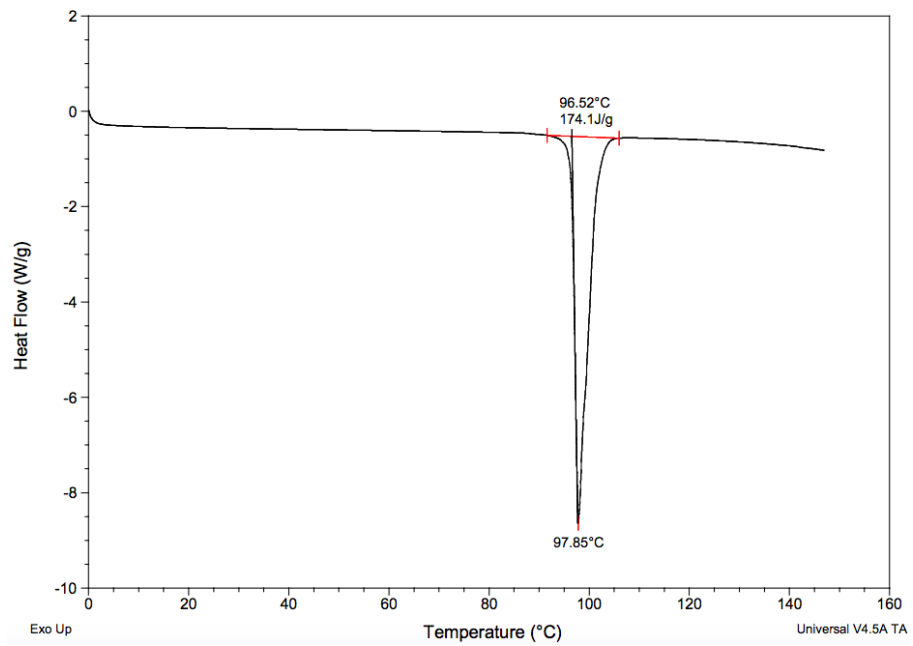
**Anexo 1. Termograma del Color amarillo**



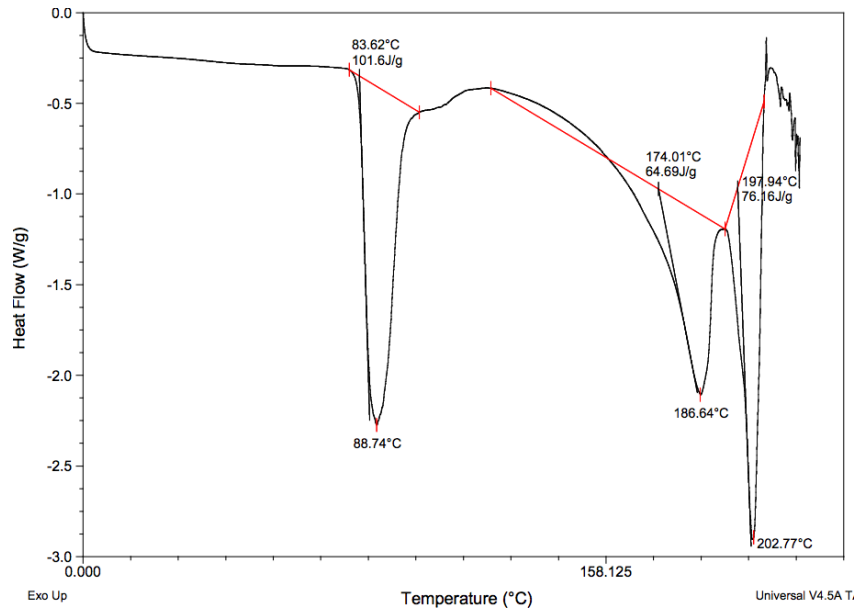
**Anexo 2. Termograma del Edetato disódico**



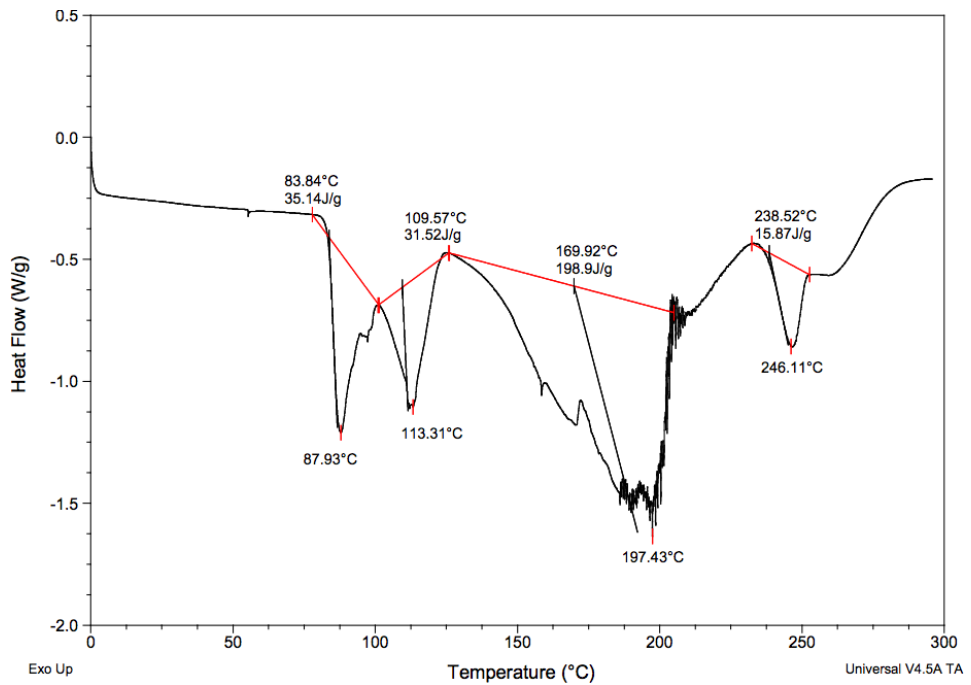
**Anexo 3. Termograma del Metilparabeno**



**Anexo 4. Termograma del Propilparabeno**



**Anexo 5. Termograma de la Mezcla de Metilparabeno, propilparabeno y color amarillo**



**Anexo 6. Termograma de la Mezcla de Metilparabeno, propilparabeno, EDTA y color amarillo**