EVALUACIÓN DE DOS PRODUCTOS NATURALES A BASE DE EXTRACTOS DE CÍTRICOS COMO ALTERNATIVA DE REEMPLAZO DEL TRICLOSÁN EN JABONES ANTIBACTERIALES

AHIDALY YINETH GARCIA GARCIA

UNIVERSIDAD DE SANTANDER UDES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BUCARAMANGA
2017

EVALUACIÓN DE DOS PRODUCTOS NATURALES A BASE DE EXTRACTOS DE CÍTRICOS COMO ALTERNATIVA DE REEMPLAZO DEL TRICLOSÁN EN JABONES ANTIBACTERIALES

AHIDALY YINETH GARCIA GARCIA

Trabajo de grado como requisito para optar el título de Microbiólogo Industrial en la Universidad de Santander

Director
JENNY ADRIANA LAGUADO
Ing. Biotecnològica

Codirectora
Sandra Lorena Contreras Contreras
MSc. Gerencia Inocuidad en Alimentos

UNIVERSIDAD DE SANTANDER UDES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BUCARAMANGA
2017

Nota de aceptación

3.8

Jenny Adriana Laguado Sanguino
Ing. Biotecnológica
Firma de Director Trabajo de Grado

Christian Chacín Zambrano
MSc. Biotecnología microbiana
Firma Evaluador

Indira Paola Hernández Peñaranda
MSc. Ciencias Básicas Biomédicas
Firma Evaluador

Bucaramanga, 01 de Diciembre de 2017

AGRADECIMIENTOS

A mi Universidad y profesores por el conocimiento adquirido, la ética y así brindarme un futuro.

A la compañía Protécnica Ingeniería S.A.S por permitirme formarme como profesional y darme la oportunidad de desarrollar el trabajo de grado y a todas aquellas personas de la compañía que participaron en la realización de este trabajo.

A la Ing. Jenny Adriana Laguado, por la confianza brindada durante este tiempo, por su orientación en la realización de esta Trabajo de grado, por el tiempo dedicado, así como su constante estímulo, sin los cuales este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo.

A mi profesora Sandra Contreras por darme la oportunidad de trabajar junto a ella y guiarme en este proceso de formación, y en la elaboración este trabajo.

DEDICATORIA

A Dios por darnos la vida, por fortalecerme en cada etapa de este largo camino y a mis padres Clemencia García y Pablo Dennis García que con su amor, dedicación y esfuerzo me ayudaron a cumplir mi sueño de ser Microbióloga Industrial.

A mis compañeros y amigos en especial Angélica y Julieth Ramírez, por ser mi compañía durante mi formación, siempre con sus buenos consejos y ánimos, me abrieron sus puertas para quedarme.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN 16

1. ANTECEDENTES 17

1.1. Lavados de las Manos 17

1.2. Fisiología cutánea 17

1.3. Tipos de flora bacteriana presentes en la piel. 17

1.3.1. Flora residente. 17

1.3.2. Flora transitoria. 17

1.4 Técnica de lavado de manos 18

1.4.1 Lavado de manos social. 18

1.4.2 Lavado de manos clínico. 18

1.4.3 Lavado de manos quirúrgico. 18

1.5 Productos utilizados para la higiene de manos 18

1.6 Revisión de los compuestos empleados para la higiene de manos 20

1.6.1 Agua 20

1.6.2 Temperatura del agua 20

1.6.3 Secado de manos 20

1.6.4 Jabón simple. 21

1.7 Triclosán y compuestos relacionados 21

1.7.1 Definición, estructura y propiedades del triclosán y compuestos relacionados. 21

1.7.2 Aplicaciones. 22

1.7.3 Toxicidad. 22

1.8 Extractos Naturales 23

1.8.1 La alternativa de los extractos naturales. 23

1.8.2 Extractos de Plantas. 23

1.8.3 Aceites Esenciales. 24

1.9 Susceptibilidad de las bacterias Gram negativas y positivas 26

1.10 Mecanismo de acción de los compuestos activos de los aceites esenciales 28

1.13 Condiciones óptimas para desarrollar la capacidad antibacteriana de los aceites esenciales y sus compuestos 31

1.14 Aspectos legales del uso de los aceites esenciales y sus compuestos 32

2. OBJETIVOS 33

2.1. Objetivo General 33

2.2. Objetivos Específicos 33

3. METODOLOGÍA 34

3.1. Diseño de la investigación 34

3.2. Población de estudio y muestra 34

3.3. Microorganismos 34

3.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria CMI y su estabilidad en el tiempo de cada uno de los productos a evaluar (instructivo código i-mb-6, basado en NTC 2455. Desinfectantes) 37

3.4.1. Preparación del inóculo. 37
3.4.2. Acondicionamiento de los jabones con los activos puros. 37
3.4.3. Preparación de la muestra. 37
3.4.4. Cálculos. 37
3.4.5. Determinación de la Concentración mínima bactericida CMB. 37

3.5. Prueba para determinación de tiempo de contacto método de kelsey maurer (instructivo código i-mb-6, basado en ntc 5473. desinfectantes) 37

3.5.1. Suspensión bacteriana. 37
3.5.2. Determinación de la viabilidad. 37
3.5.3. Determinación de tiempo de contacto. 38
3.5.5. Determinación de la efectividad. 39

3.6. Técnica de susceptibilidad por disco en agar (Kirby-Bauer) 39

3.6.1. Preparación del inóculo. 39
3.6.2. Preparación de los discos. 39
3.6.3. Siembra de la muestra. 39

3.7. Valoración de las condiciones higiénicas de las manos del personal de diferentes áreas de la compañía. (Villalobos & Mendoza, 2015) 40

3.7.1 Selección de los participantes del estudio. Según el decreto 8430 de 1993 de Ministerio de Salud. Capìtulo II De investigación Farmacologica. 40

Existen diferentes factores que influyen sobre el tipo de flora microbiana que puede estar presente en las manos, tales como el área donde se desarrollan las actividades diarias, el tipo de actividad que se realiza, la frecuencia en el lavado de las manos, etc. 40

Teniendo en cuenta lo anterior se consideró la inclusión de personal en tres áreas diferentes de la compañía (área administrativa, laboratorios y producción), en todos los casos los voluntarios debían cumplir con los siguientes criterios: 40

3.7.2 Criterios de inclusión: 40

- Sexo indiferente 40
- Edades que oscilan entre 18-50 años 40
- No presentar ningún tipo de heridas, irritación, infección o descamación en las manos. 40

- **No presentar ningún tipo de alergia conocida a los componentes típicos de una formulación de jabón antibacterial. 40**
- **Afiliación a EPS 40**

3.7.3 Criterios de exclusión: 40

- **Presencia de cualquier enfermedad o patología cutánea en las manos 40**
- **Alergia a algunos de los componentes del producto en estudio 40**
- **Tener un tratamiento tópico para combatir problemas dermatológicos en las manos 40**

3.7.4 Cantidad de voluntarios y Convocatoria 40

Con el fin de poder realizar un análisis estadístico, se consideró realizar la evaluación de cada activo antimicrobiano sobre 3 voluntarios por cada área de la compañía, lo cual corresponde a 9 voluntarios por activo evaluado para un total de 27 voluntarios. 40

Nota: Cada voluntario fue informado sobre los objetivos del estudio, la metodología y consentimiento. (Ver Anexo 17). 40

3.7.1. Microorganismos a evaluar. 40
3.7.2. Técnica de lavado de manos. 40
3.8 Método del hisopado. 41
3.9 Toma de muestra patrón. 41

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 42

4.1. Determinación de la efectividad de los activos en los jabones a través del tiempo mediante las técnicas concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima concentración bactericida (CMB). 42

4.1. Comparación de la acción bactericida de los extractos cítricos y Triclosán mediante las técnicas de Kelsey Maurer y Kirby-Bauer frente a los microorganismos evaluados. 48

4.2.1 Tiempo de contacto de los activos puros antimicrobianos, mediante el Método de Kelsey Maurer (Instructivo código I-MB-6, Basado en NTC 5473) 48

4.2.2 Técnica de susceptibilidad por disco en agar (Kirby-Bauer) 50

4.3.1. Interacciones de la eficacia promedio de los jabones antimicrobianos frente a la carga microbiana tomada en cada una de las áreas bajo estudio. 57

5. CONCLUSIONES 62

6. RECOMENDACIONES 63

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 64

ANEXOS 70

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. .Efecto antibacteriano de aceites esenciales y principios activos. _____25

Cuadro 2. La identificación de los microorganismos se confirmó mediante coloración de Gram, y siembra en agares selectivos. _____34

Cuadro 3. Características de los productos a evaluar. _____36

Cuadro 4. Concentraciones de activos antimicrobianos estándares para el estudio. _____38

Cuadro 5. Concentración inicial de los microorganismos a evaluar._____38

Cuadro 6. Tamaño halos de inhibición (mm), promedio, de los extractos 1, 2 y Triclosán. ____51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras del triclosán (TCS), metiltriclosán (MTCS), 2,4-diclorofenol (2,4DCF), 2, 3,4 triclorofenol (2, 3,4TCF) y el 2, 4,6triclorofenol (2,4,6TCF). _____22

Figura 2. Esquema de las membranas celulares de las bacterias gram positivas y negativas: LPS, lipopolisacáridos; PP, poros; C, membrana citoplasmática y proteínas; BP, proteínas; PPs, espacio periplásmico; A, proteínas de membrana externa; LP, lipoproteínas. Fuente: (Sikkema & Poolman, 1995). _____27

Figura 3. Localización y mecanismos de acción de los componentes de los aceites esenciales sobre la célula bacteriana: degradación de la pared cellular (Helander & Alakomi, 1998) de la membrana citoplasmática (Uter & Schnuch, 2001); daño de las proteínas de membrana (Juven et al., 1994; Ultee et al., 1999); salida de contenido celular Lambert et al (2001), coagulación del citoplasma y inhibición de la fuerza motriz de protones. _____28

Figura 4. Mínima concentración inhibitoria y mínima concentración bactericida de los jabones con activos antibacteriales en estabilidad._____42

Figura 5. Mínima concentración inhibitoria y mínima concentración bactericida de los jabones con activos antibacteriales en estabilidad._____43

Figura 6. Mínima concentración inhibitoria y mínima concentración bactericida de los jabones con activos antibacteriales en estabilidad._____44

Figura 7. Mínima concentración inhibitoria y mínima concentración bactericida de los jabones con activos antibacteriales en estabilidad._____45

Figura 8. Mínima concentración inhibitoria y mínima concentración bactericida de los jabones con activos antibacteriales en estabilidad._____46

Figura 9. Mínima concentración inhibitoria y mínima concentración bactericida de los jabones con activos antibacteriales en estabilidad._____47

Figura 10. Determinación de la actividad bactericida de los activos antimicrobianos. Representadas en la reducción de unidades logarítmicas que presentó cada microorganismo. __49

Figura 11.Intervalos de confianza para mohos y levaduras, de acuerdo al area y efectividad del producto. _____53

Figura 12.Intervalos de confianza para Aerobios mesófilos, de acuerdo al area y efectividad del producto. _____54

Figura 13. Intervalos de confianza para *E.coli*, de acuerdo al area y efectividad del producto. _55

Figura 14. Intervalos de confianza para *S.aureus*, de acuerdo al area y efectividad del producto. _____56

Figura 15. Interacciones de la media Mohos y Levaduras entre activos y Area._____57

Figura 16. Interacciones de la media Aerobios Mesófilos entre activos y Area. 58
Figura 17. Interacciones de la media *E.coli* entre activos y Area. 59
Figura 18. Interacciones de la media *S. aureus* entre activos y Area. 60
Figura 19. Medias de los microorganismos por Activo Antimicrobiano. 61

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Activos antimicrobianos evaluados. _____68

ANEXO 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los activos puros para formular los activos bajo estudio.. _____72

ANEXO 3. Apariencia de los jabones con los activos antimicrobianos a medida de transcurso del tiempo. _____70

ANEXO 4. Procedimiento de la evaluación de los tiempos y concentraciones de los extractos cítricos y Triclosán (Kelsen Maurer). _____73

ANEXO 5. Procedimiento de la evaluación de la actividad antimicrobiana utilizando la técnica de difusión de disco en agar de Kirby-Bauer. _____74

ANEXO 6. Metodología de la OMS (Organizacion mundial de la Salud) para el correcto lavado de las manos. _____75

ANEXO 7. Procedimiento de la evaluación de los extractos cítricos y el Triclosán en los jabones antibacteriales._____76

ANEXO 8. Concentraciones obtenidas de la MIC de cada uno de los jabones con los activos antimicrobianos durante los 3 meses en estabilidad._____77

ANEXO 9. Concentraciones obtenidas de la MIB de cada uno de los jabones con los activos antimicrobianos durante los 3 meses en estabilidad._____78

ANEXO 10. Recuentos de las ufc en los tiempos establecidos para el Extracto 1 en cada uno de los microorganismos utilizados en la prueba de Kelsey Maurer. _____79

ANEXO 11. Recuentos de las ufc en los tiempos establecidos para el Extracto 2 en cada uno de los microorganismos utilizados en la prueba de Kelsey Maurer. _____81

ANEXO 12. Recuentos de las ufc en los tiempos establecidos para el Triclosán en cada uno de los microorganismos utilizados en la prueba de Kelsey Maurer. _____83

ANEXO 13. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana utilizando la técnica de difusión de disco Kirby-Bauer para cada uno de los activos antimicrobianos evaluados. _____83

ANEXO 14. Jabón Base Para la preparación con los activos antimicrobianos.. _____88

ANEXO 15. Jabones utilizados en el procedimiento del lavado de las manos en las diferentes áreas de la compañia. _____88

ANEXO 16. Datos de la efectividad del lavado de manos con los activos antimicrobianos sobre el personal de las distintas áreas de la compañía. _____89

ANEXO 17. Concentimiento informado _____72

RESUMEN

TITULO: EVALUACIÓN DE DOS PRODUCTOS NATURALES A BASE DE EXTRACTOS DE CÍTRICOS COMO ALTERNATIVA DE REEMPLAZO DEL TRICLOSÁN EN JABONES ANTIBACTERIALES

Autor: Ahidaly Yineth Garcia Garcia

Palabras claves: Extractos, jabón, activos, antimicrobianos.

Descripción: Actualmente, los organismos reguladores de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), han aumentado las exigencias para asegurar la calidad de los productos y como prioridad se están enfocando en gran medida, en programas de limpieza y desinfección de manos, y en áreas de las plantas de producción, debido a los riesgos asociados con la contaminación cruzada que puede darse entre diferentes productos alimenticios.

En el presente estudio se evaluó dos productos naturales a base de extractos de cítricos como alternativa de reemplazo del triclosán empleados en jabones antibacteriales de manos.

Para ello se realizaron dos (2) técnicas Kelsey Maurer y Kirby-Bauer. En la primera estableció 90 segundos como el tiempo óptimo de efectividad del extracto 2 al 0.5%, a partir de la reducción logarítmica hallada de los valores obtenidos; y en la segunda se observó sensibilidad en el triclosán, y resistencia en los extractos según el tamaño de inhibición, para los microorganismos *B.cereus, E.coli y S.aureus,* y al emplear el protocolo del lavado de manos recomendada por la Organización mundial de la salud (OMS), para la cuantificación de la flora fúngica y bacteriana en las manos, se halló que el uso del Extracto 2 como activo, en el jabón antibacterial, redujo significativamente unidades logarítmicas de bacterias y hongos frente al triclosán.

ABSTRACT

TITULO: EVALUATION OF TWO NATURAL PRODUCTS BASED ON CITRUS EXTRACTS AS AN ALTERNATIVE OF TRICLOSAN REPLACEMENT IN ANTIBACTERIAL SOAPS.

Author: Ahidaly Yineth Garcia Garcia

Key words: Extracts, soap, active, antimicrobial.

Description: Currently, the regulatory bodies of Good Manufacturing Practices (GMP), have increased the requirements to ensure the quality of products and as a priority are focusing largely on hand cleaning and disinfection programs, and in production areas plants, due to the risks associated with cross-contamination that may occur between different food products.

In the present study, two natural products based on citrus extracts were evaluated as an alternative to the replacement of Triclosán used in antibacterial hand soaps.

For this, two (2) Kelsey Maurer and Kirby-Bauer techniques were performed. In the first set 90 seconds as the optimal time of effectiveness of extract 2 to 0.5%, from the logarithmic reduction found of the values obtained; and in the second, sensitivity was observed in the triclosán, and resistance in the extracts according to the size of the inhibition, for the microorganisms *B.cereus, E.coli and S. aureus*, and when using the protocol of hand washing recommended by The World Health Organization Organization (WHO), for the quantification of the fungal and bacterial flora in the hands, it was found that the use of Extract 2 as active, in antibacterial soap, significantly reduced the logarithmic units of bacteria and fungi in comparison with the triclosán.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las empresas se preocupan cada vez más por la implementación de estrategias de mejoramiento que minimicen los casos de contaminación fisicoquímica y microbiológica en los productos.

El lavado de las manos es el método más conocido y sencillo, en el cual puede emplearse jabón antibacterial, con el objetivo de reducir los casos de contaminación cruzada. El triclosán es uno de los principales activos empleados en jabones antibacteriales, el mismo fue incluido en 1986 en la lista de activos aprobados por la Directiva de Cosméticos de la Comunidad Europea para prevenir la propagación de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina; Sin embargo, actualmente existe gran preocupación por sus posibles efectos sobre la salud. Diversos estudios lo catalogan como un "posible carcinógeno" (IARC - Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer), otras investigaciones han demostrado que mutaciones en el gen bacteriano que produce ENR - Enoil-ACP Reductasa (NADPH Específica B) - puede producir bacterias resistentes. El triclosán también se ha vinculado a preocupaciones ambientales (EPA, 2008).

En este sentido La administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) dio a conocer el 2 de Septiembre de 2016, la regla definitiva que prohíbe la comercialización de los jabones antisépticos de venta libre (OTC, por sus siglas en inglés) que contienen ciertos ingredientes, entre ellos el triclosán. Lo cual crea la necesidad de avanzar en investigaciones que permitan encontrar alternativas viables para el reemplazo de este activo en dichos jabones.

Existe gran cantidad de estudios en la literatura que revelan que los extractos naturales de las plantas, poseen acción antioxidante, antiviral, antimicótica, repelente, antitumoral y antibacteriana (Sharma & Garg, 2011). Estas sustancias han entrado a competir con sucedáneos sintéticos que pueden presentar efectos nocivos para la salud. Los aceites esenciales son sustancias orgánicas constituidas por terpenos, sesquiterpenos, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos que se localizan en determinados órganos de la planta Botelho et al (2003).

Los extractos naturales también se han utilizado en innumerables ensayos y aplicaciones en diversos alimentos, bebidas y cosméticos. Sin tener alguna limitante en su utilización, ya que los mismos gozan de estatus GRAS (generally recognized as safe o generalmente reconocido como seguro) según la clasificación de sus componentes por la FDA.

Por esta razón, el objetivo de la presente investigación es la evaluación de dos extractos cítricos frente al triclosán, durante el desarrollo de la misma se incluirá un seguimiento mensual mediante la determinación de la CMI de los jabones antibacteriales formulados con los productos propuestos por un periodo de 3 meses, así mismo se empleara el método de tiempo de contacto y de susceptibilidad por disco para determinar la susceptibilidad de las cepas de referencia disponibles en el laboratorio a los activos evaluados y por último se realizara la evaluación de efectividad de un jabón antibacterial formulado con el mejor extracto frente al triclosán, en las manos de personal de la compañía.

1. ANTECEDENTES

1.1. Lavados de las Manos

Por siglos, el lavado de manos con agua y jabón ha sido considerado una medida de higiene personal. A mediados del siglo XIX, cuando en 1822 un farmacéutico francés, demostró que las soluciones cloradas erradicaban la totalidad de los olores asociados con los cuerpos (Labarreque, 1829). En 1843, un médico americano, Oliver Wendell Holmes, llegó a la conclusión de que la fiebre puerperal se transmitía de una paciente a otra por medio de los médicos y enfermeras que los atendían, impuso como práctica sanitaria el lavado de manos antes y después de la atención de las pacientes y logró reducir la fiebre puerperal (Puerperio: período comprendido desde el parto hasta el retorno de la menstruación, de unas seis semanas de duración, caracterizado por la lactancia y la evolución de los órganos genitales hacia su estado normal), significativamente, generando un gran impacto al demostrar la importancia del lavado de manos en la prevención de la transmisión de la enfermedad, el húngaro, Ignaz PhilIip Semmelweis (1983), fue el primero en probar científicamente la importancia del lavado de manos con antiséptico. Semmelweis (1983) Publicó los resultados de los estudios en 1861, 662 años después de los escritos de Maimonides. En 1878, Luis Pasteur presenta su informe "Teoría de los gérmenes y su aplicación en la medicina y la cirugía"; durante los años siguientes los científicos continuaron identificando bacterias y su relación con las enfermedades (Rosenthal & Ezcurra, 1999).

1.2. Fisiología cutánea

El cuerpo del ser humano presenta una gran superficie cutánea y mucosa por la que entra en contacto con el medio ambiente.

La piel humana se encuentra colonizada por múltiples microorganismos que viven como saprófitos en la superficie, en las fisuras entre las escamas del estrato córneo y dentro de los folículos pilosos por sus diferentes características de humedad, temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes, los cuales en algunas situaciones estos microorganismos pueden volverse patógenos (Roth & James, 1989).

1.3. Tipos de flora bacteriana presentes en la piel.

La flora humana normal está conformada por bacterias, hongos y parásitos, y se dividen en dos grandes grupos: flora residente y la flora transitoria Fitzpatricks et al (1999) .

1.3.1. Flora residente.

Los organismos característicos que siempre están adheridos a la superficie cutánea son los llamados residentes, los cuales se encuentran como constituyentes dominantes de la piel.

Se divide en 2 grandes grupos bacterianos, el mayor, conformado por bacterias corineiformes y por estafilococos; un grupo menor, los micrococos y acinetobacter; flora fúngica de la familia de Malassezia y flora parasitaria con Demodex (Roth & James, 1989).

1.3.2. Flora transitoria.

Los constituyentes de la flora transitoria simplemente son depositados en la superficie de la piel desde el medio ambiente, pero no tienen la capacidad de adherirse a ella, puede incluir bacterias potencialmente patógenas para el propio individuo.

Se encuentra representada principalmente por bacterias Gram (+) como Estreptococo del grupo A, *S. aureus*, y del género de *Neisseria*; flora fúngica como *Candida albicans* (Roth & James, 1989).

1.4 Técnica de lavado de manos

El lavado de manos es el más sencillo, de bajo costo e importante procedimiento en la prevención de propagar gérmenes, logrando reducir su incidencia cuando se realiza de manera adecuada. La efectividad para reducir la difusión de microorganismos depende de tres factores: la ocasión, la solución utilizada y la técnica de lavado de manos.

1.4.1 Lavado de manos social.

Es lavado de manos de rutina, se define como la remoción mecánica de suciedad y la disminución de microorganismos transitorios de la piel. Este lavado de manos requiere de jabón común líquido, debe hacerse de forma vigorosa con una duración no menor de 15 segundos.

1.4.2 Lavado de manos clínico.

Se lleva a cabo con una solución jabonosa antiséptica de amplio espectro microbiano, que tiene una pronta acción, no es irritante y está diseñado para su uso en situaciones de brotes de infección hospitalarias.

1.4.3 Lavado de manos quirúrgico.

Es el lavado efectuado por los integrantes del equipo quirúrgico antes de su ingreso al quirófano, siempre está indicado un jabón antiséptico. Se debe nombrar que el uso del cepillado no es necesaria para reducir la carga microbiana cuando se utiliza antiséptico con efectos residual. (Villavicencio & Ochoa , 2006).

1.5 Productos utilizados para la higiene de manos

- **Jabones sin antiséptico** (sólidos, líquidos, polvo). Pertenecen al grupo de los tensioactivos aniónicos. Son sales sódicas o potásicas de diversos ácidos grasos. Su capacidad de limpieza reside en sus propiedades detergentes que retiran el polvo y la suciedad de las manos así como diversas sustancias orgánicas. Tienen muy poca o ninguna actividad antimicrobiana intrínseca, y no son lo suficientemente eficaces para eliminar por completo los microorganismos patógenos de las manos del personal sanitario.

- **Yodo y yodóforos.** Pertenecen al grupo de compuestos halogenados. Se conocen las propiedades antisépticas del yodo desde hace mucho tiempo. Pero como irrita y tiñe la piel, los más modernos yodóforos los han sustituido como principio activo de estos antisépticos, ya que consiguen una liberación de yodo molecular más sostenida en el tiempo y reducen la irritación de la piel. Los yodóforos son compuestos de yodo elemental y yoduros unidos a un polímero portador que libera sostenidamente moléculas de yodo que son las realmente activas. Las moléculas de yodo rápidamente penetran la pared celular de los microorganismos y los

inactivan formando complejos con aminoácidos y ácidos grasos insaturados impidiendo la correcta síntesis proteica y alterando las membranas celulares (Cunha & Matos, 2017).

- **Alcoholes.** La mayoría de antisépticos de manos con base alcohólica contienen isopropanol (también llamado alcohol isopropílico, 2-propanol, propan-2-ol), etanol, 1-propanol (también llamado propan-1-ol o alcohol propílico), o una combinación de dos de estos productos. La actividad antimicrobiana de los alcoholes se atribuye a su capacidad de desnaturalizar las proteínas. Soluciones de alcohol en concentraciones del 60% al 95% son las más eficaces y más altas son menos potentes porque las proteínas no se desnaturalizan fácilmente en ausencia de agua. Los alcoholes tienen excelente actividad germicida in vitro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluyendo patógenos multi-resistentes, *Mycobacterium tuberculosis*, y varios hongos (Aly & Maibach, 1979).

- **Biguanidinas:**

  - **Clorhexidina.** El gluconato de clorhexidina actúa a nivel de las membranas citoplásmicas generando la liberación de los componentes y la inmediata muerte celular. La actividad antimicrobiana tarda más tiempo en alcanzarse que con los alcoholes. Es más activa frente a Gram-positivos que frente a Gram-negativos y hongos y apenas tiene actividad frente a micobacterias (Uter & Schnuch, 2001). La clorhexidina irrita la piel en función de su concentración: los productos al 4% causan dermatitis si se usan con frecuencia. Son raras las alergias a la clorhexidina.

- **Fenoles:**

  - **Hexaclorofeno.** Es un derivado fenólico (bifenol) con actividad bacteriostática. Su actividad antiséptica se explica por inactivación de importantes procesos enzimáticos del metabolismo bacteriano. Tiene actividad frente a bacterias Gram positivas (especialmente frente a *S. aureus*) pero pobre frente a bacterias Gram negativas, hongos y micobacterias. La eficacia del hexaclorofeno es modesta después de un lavado, pero tiene actividad residual de varias horas y efecto acumulativo (con los sucesivos lavados reduce la concentración de bacterias en la piel). Se formula a una concentración al 3%. Se le ha atribuido un efecto neurotóxico cuando se emplea para el lavado de neonatos; y en cuanto al lavado de manos, la Food and Drug Administration (FDA) de los EEUU, considera que no es seguro ni efectivo.

  - **Cloroxilenol.** Es un derivado fenólico (halofenol) cuya actividad antiséptica se explica por la inactivación enzimática y la ruptura de la pared bacteriana. Se le conoce también como paraclorometaxylenol (PCMX) y se ha usado como principio activo en varios jabones antisépticos. Tiene muy buena actividad in vitro sobre los organismos Gram positivos y buena sobre Gram negativos, micobacterias y algunos virus. El PCMX es menos activo frente a *P. aeruginosa* pero si se le añade ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) esta

actividad se incrementa notablemente frente a éste y otros patógenos. El PCMX no actúa tan rápidamente como la clorhexidina o los yodóforos y tiene una actividad residual más corta. Se formula en concentraciones del 0,3 al 3,75%. Pese a que el compuesto se absorbe por la piel se tolera bien y no es común la reacción alérgica.

- **Compuestos de amonio cuaternario:** Son agentes tensioactivos catiónicos. El cloruro de benzalconio es el más ampliamente usado como antiséptico de este grupo. Es básicamente bacteriostático y fungistático. Son más potentes contra Gram positivos que frente a Gram negativos. Su actividad contra micobacterias y hongos es relativamente débil pero aceptable frente a virus con envuelta. Su actividad antimicrobiana se afecta por la presencia de materia orgánica y no son compatibles con detergentes aniónicos. Estos compuestos son bien tolerados por el personal, pero se contaminan fácilmente por bacterias Gram negativas. En general no se recomienda su uso como medida única, aunque se están realizando estudios comparando mezclas de alcoholes y amonios cuaternarios, con la hipótesis de que el uso de esta mezcla consigue mejores resultados que los componentes por separado.

1.6 Revisión de los compuestos empleados para la higiene de manos

1.6.1 Agua

El agua es un buen disolvente para un gran número de sustancias, se le conoce como el disolvente universal. Es estable, tiene un punto de ebullición alto y tiene muy alta tensión superficial, una característica importante para la limpieza de las manos. Debido a sus propiedades, el agua no puede eliminar algunas sustancias como grasas, aceites y proteínas que son componentes orgánicos. Para una limpieza eficaz de las manos, es primordial que la suciedad se disuelva o quede suspendida en el agua para que pueda ser arrastrada Luby et al (2005).

1.6.2 Temperatura del agua

Un comunicado donde se determinó el impacto de diferentes temperaturas entre 5ºC, y 50ºC (120ºF) en la eliminación de diferentes tipos de bacterias evidenciaron que la temperatura no tiene ningún efecto en la reducción de la flora transitoria o residual (Krumm, 2002). Se examinó la flora residente y transitoria de los voluntarios, quienes se lavaron las manos con diferentes temperaturas usando una cantidad específica de jabón normal líquido. Se enjabonaron las manos durante 15 segundos y se las enjuagaron durante 10 segundos. Ni el uso de jabón medicado, ni la temperatura del agua tuvieron un efecto significativo en la eliminación de bacterias. Al parecer, el tiempo de contacto y la fricción son aspectos más importantes que la temperatura. (Strang, 2003)

1.6.3 Secado de manos

El secado de manos es un paso importante en la limpieza de manos y debe realizarse de tal manera que no se produzca una nueva contaminación de las manos. Las manos húmedas, como un ambiente húmedo en comparación con un ambiente seco, ofrecen mejores condiciones para la transmisión de microorganismos Patrick et al (1997). En un estudio comparativo que realizó Yamamoto et al (2005) para probar la eficiencia del secado de manos para eliminar las bacterias de las manos lavadas, resultó peor secar las manos con aire caliente que con una toalla de papel. Además, los secadores de aire pueden resultar menos prácticos porque se necesita más tiempo para lograr secar las manos, con el posible impacto negativo en el cumplimiento de la

higiene de manos, y por la pulverización de patógenos acuáticos. Idealmente el secado de manos debe realizarse usando toallas de papel individuales. Sin embargo, el recuento de bacterias en la palma y dedos después del lavado de manos, puede no diferir significativamente tras secarse con una toalla de papel (Ngeow, Ong, & Tan, 1989).

1.6.4 Jabón simple.

Los jabones son productos a base de detergentes, que contienen ácidos grasos esterificados y sodio. Están disponibles en diversas formas, incluyendo pastilla de jabón, tejido, hoja y preparaciones líquidas. Los jabones simples tienen una mínima, si la tienen, actividad antimicrobiana. Sin embargo, el lavado de manos con jabón simple puede eliminar la flora transitoria de baja adherencia. Por ejemplo, lavarse las manos con jabón simple y agua durante 15 segundos reduce el recuento bacteriano en la piel entre 0,6-1,1 log10, mientras que lavárselas durante 30 segundos reduce el recuento entre 1,8-2,8 log10 (Rotter, 1999).

1.7 Triclosán y compuestos relacionados

1.7.1 Definición, estructura y propiedades del triclosán y compuestos relacionados.

El triclosán [5cloro2- (2,4diclorofenoxi) fenol], TCS, es un fenoxifenol triclorado comercializado que presenta propiedades antibacterianas, usado como preservativo, fungicida y biocida en diversos productos de limpieza, cosméticos, textiles y productos alimenticios. Es un polvo blanquecino escasamente soluble en agua, hidrolíticamente estable y poco volátil, con una elevada hidrofobicidad.

El Triclosán se encuentra listado ante la EPA (Environmental Protection Agency) como un pesticida bajo el código químico activo 054901.

Un total de 2385 patentes contienen la palabra “Triclosán” dentro de la Oficina de Patentes y Marcas Registradas de Estados Unidos entre el año 1976 y Abril de 2008 (FDA, 2010).

El metiltriclosán [5cloro2- (2,4diclorofenoxi) anisol], MTCS, es un anisol generado en procesos de biometilación del triclosán, cuyas propiedades físicoquímicas le proporcionan carácter bioacumulativo (Balmer, Buser, Müller, & Poiger, 2005). Los clorofenoles anteriores se consideran posibles productos de hidrólisis del triclosán en medio acuoso. El 2,4 diclorofenol (2,4DCF) y el 2, 3,4triclorofenol (2, 3,4 TCF) fueron propuestos inicialmente como subproductos de hidrólisis (Rule, Ebbett, & Vikesland, 2005), aunque estudios posteriores, pusieron de manifiesto que son el 2, 4,6 triclorofenol (2, 4,6TCF) junto con el 2,4 diclorofenol los productos finales generados en reacciones de oxidación e hidrólisis del triclosán (Rule, Ebbett, & Vikesland, 2005).

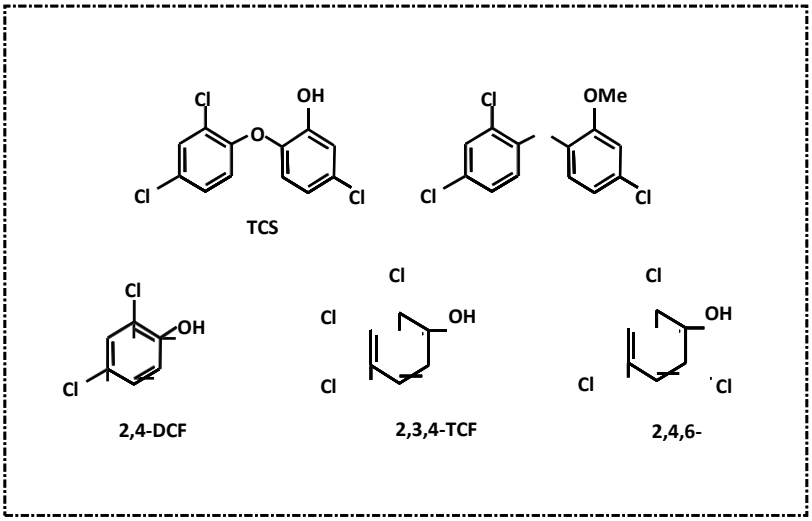


Figura 1. Estructuras del triclosán (TCS), metiltriclosán (MTCS), 2,4-diclorofenol (2,4-DCF), 2, 3,4-triclorofenol (2, 3,4-TCF) y el 2, 4,6-triclorofenol (2, 4,6-TCF). Fuente: *(Rule, Ebbett, & Vikesland, 2005)*

1.7.2 Aplicaciones.

El triclosán exhibe un amplio espectro bactericida contra las bacterias Gram + y Gram -, además de mohos y levaduras. Su efecto antibacteriano es debido a la inhibición que ejerce sobre la proteína transportadora enoilacil reductasa (ENR), encargada de la biosíntesis de ácidos grasos necesarios para la formación de las paredes celulares y la reproducción de las bacterias (Singer, Müller, Tixier, & Pillonel, 2002).

Triclosán, agente antimicrobiano de amplio espectro sintético que se ha usado ampliamente durante más de 20 años en una variedad de productos de consumo, incluyendo pasta de dientes, enjuagues bucales, desodorantes, jabones, textiles (por ejemplo, calcetines, ropa interior), juguetes, jabón líquido para lavar platos y utensilios de cocina de plástico (Calafat, Ye, Wong, Reidy, & Needham, 2008). En el ámbito clínico el triclosán es utilizado como antiséptico, desinfectante o conservante. También se incorpora en la superficie de dispositivos médicos, materiales plásticos, textiles, utensilios de cocina, etc., de la que podría lixiviar lentamente durante un largo período de tiempo durante su uso, para llevar a cabo su acción biocida (SCCS, 2010).

1.7.3 Toxicidad.

El Triclosán fue incluido en 1986 en la Directiva de Cosméticos de la Comunidad Europea para su uso como conservante en los productos cosméticos en cantidades de hasta 0,3%. Diversos estudios sobre su uso en productos de cuidado personal revelan que, a las concentraciones utilizadas (0.3 %, según RD 1599 del 17 octubre 1997), no es tóxico, carcinogénico, teratogénico, ni irritante de ojos y piel. El triclosán penetra en el cuerpo humano por contacto con la piel, las mucosas y el tracto intestinal, reduciéndose su concentración a la mitad tras 21 horas, retornando finalmente a los niveles iniciales al cabo de 8 días (Allmyr, Adolfsson-Erici, & McLachlan, 2006).

El triclosán, aunque su uso en una concentración máxima en pastas de dientes, jabones de mano, para el cuerpo (geles de ducha) y barras desodorantes se consideran seguros desde el punto de vista toxicológico de los productos individuales, la magnitud de la exposición agregada a triclosán de todos los productos cosméticos no es segura (FDA, 2010).

El mayor problema derivado de la introducción de triclosán en las formulaciones de productos de cuidado personal es su continua descarga en el medio ambiente, ya que puede producir efectos adversos sobre la flora y fauna acuática. Las algas, organismos unicelulares y peces han sido los principales organismos en los que se ha estudiado su toxicidad (Tatarazako, Ishibashi, & Teshima, 2004).

Dado que las algas comprenden el primer escalón en la pirámide alimentaria, un efecto adverso en ellas puede desembocar en un efecto en cadena para organismos de mayor tamaño. Las algas unicelulares, particularmente las algas verdes y las cianobacterias, son del orden de 30 a 80 veces más sensibles a la exposición a triclosán que otros organismos acuáticos (Orvos & Versteeg, 2002).

1.8 Extractos Naturales

1.8.1 La alternativa de los extractos naturales.

En busca del bienestar y salud humana, existe una tendencia generalizada al rechazo de todo lo que no sea natural. Esta tendencia ha dado lugar al estudio de los extractos de plantas como una de las alternativas más naturales a los antibióticos promotores del crecimiento.

Los extractos de plantas son compuestos naturales a los que se les atribuyen propiedades antisépticas, antifúngicas, antioxidantes, antitumorales, etc. El efecto antimicrobiano de estas sustancias se conoce y se ha utilizado desde hace siglos. Parece ser que actúan desestabilizando la membrana celular de algunos microorganismos, alterando las propiedades de su superficie.

1.8.2 Extractos de Plantas.

Las plantas tienen una gran capacidad para sintetizar metabolitos secundarios, algunos de los cuales son responsables de su olor (terpenos), pigmentación (quinonas y taninos) o sabor (terpenos). Además, muchas de estas sustancias le sirven a la planta como mecanismo de defensa contra el ataque de microorganismos, insectos y herbívoros.

Muchos extractos de plantas se utilizan como agentes antimicrobianos, ya que han demostrado poseer la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Los principios activos de los extractos de plantas que ejercen el efecto antimicrobiano suelen ser sustancias químicas como los compuestos fenólicos, las cumarinas, los flavonoides, los taninos, las quinonas, etc. Estos compuestos se pueden dividir en varias categorías según su potencial antimicrobiano y su estructura molecular (Cowan, 1999). Los compuestos fenólicos y los terpenoides son dos de los grupos más importantes, donde podemos encontrar los componentes principales y mayoritarios de los extractos de plantas con mayor actividad antimicrobiana.

El uso de aceites esenciales para controlar las enfermedades fúngicas de las frutas es una alternativa a los fungicidas sintéticos, como es el caso de las especies de cítricos del limón y sus componentes (Simas, Amorim, & Goulart, 2017) donde el ensayo de la concentración mínima

inhibitoria confirmó que todos los aceites esenciales inhibieron el crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Trichoderma viride*.

1.8.3 Aceites Esenciales.

Los aceites esenciales son extractos de plantas obtenidos mediante la extracción con solventes orgánicos y destilación. Estos extractos son una combinación de diversas moléculas, principalmente formadas por hidrocarburos cíclicos y sus alcoholes, aldehídos o esteres derivados. Las propiedades del aceite esencial pueden variar según su composición. Inouye et al (2001) observaron que los aceites esenciales que contenían un aldehído o un fenol como principal componente fueron los más activos frente a bacterias del tracto respiratorio, seguidos por los alcoholes y, con una menor acción antimicrobiana, los aceites que contenían mayoritariamente cetonas, ésteres o hidrocarburos. La actividad de un aceite esencial está relacionada con sus componentes principales, la configuración estructural y grupos funcionales de sus compuestos, y con posibles sinergias entre los compuestos.

La capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales se está investigando tanto en la industria alimentaria y farmacéutica, donde se ha demostrado la efectividad de los aceites esenciales como antimicrobianos o antisépticos frente a bacterias patógenas. (Dorman & Deans, 2000).

1.8.3.1 Composición de los aceites esenciales.

Para la obtención de un aceite esencial, la parte de la planta que lo contiene se somete a una hidrodestilación. El análisis de la composición química de los aceites esenciales se lleva a cabo mediante cromatografía de gases y espectrofotometría de masas, con esta metodología se observa como la composición de los principios activos del extracto es variable y dependiente de la variedad de la planta y las condiciones de cultivo. Los aceites esenciales pueden llegar a tener más de 100 principios activos. Por ejemplo, Bagamboula y Uyttendaele (2004) identificaron un total de 171 compuestos en el aceite esencial de *Thymus vulgaris L*.

1.8.3.2 Propiedades de los aceites esenciales.

Existen muchos trabajos en la bibliografía que demuestran la actividad antibacteriana en medios de cultivo de diferentes aceites esenciales y de algunos de sus componentes frente a una gran variedad de bacterias patógenas. Entre los componentes de diferentes aceites esenciales con mayor actividad y con un amplio espectro de efectividad antimicrobiana encontramos: el timol (tomillo, orégano), el carvacrol (orégano y tomillo), el cinemaldehído (canela) y el eugenol (canela, clavo y pimienta).

Los aceites esenciales no sólo inhiben el crecimiento de la bacteria, sino que también poseen la capacidad de inhibir la germinación de esporas, como en el caso de *Clostridium botulinum o Bacillus cereus* Chaibi et al (1997), y tienen la capacidad de alterar la patogenicidad de las bacterias alterando la producción de toxinas. Smith-Palmer (Smith, Stewart, & Fyfe, 1998) demostraron que el aceite de *Thymus vulgaris*, además de tener una buena actividad antimicrobiana contra *L. Monocytogenes*, alteró la producción de toxinas de esta bacteria patógena y redujo la producción de dos proteínas extracelulares claves para su patogenicidad.

Otros estudios han demostrado la actividad antifúngica de los aceites esenciales (Karaman, Digrak, Ravid, & Ilcim, 2001). Daferera y Ziogas (2003) determinaron el efecto de 20

principios activos de aceites esenciales sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas de una cepa toxicogénica de *Aspergillus flavus*. Sólo 5 compuestos (todos ellos aceites alifáticos, aldehídos aromáticos o fenoles), entre ellos el timol que fue efectivo a dosis inferiores al resto de aceites esenciales, suprimieron completamente el crecimiento y la síntesis de aflatoxinas. De nuevo, el timol y el eugenol demostraron su actividad antifúngica sobre el crecimiento y producción de toxinas de *Penicillium citrinum* en medios de cultivo y en alimentos. (Karaman, Digrak, Ravid, & Ilcim, 2001)

Algunos aceites esenciales, debido a su contenido en compuestos fenólicos, también poseen una cierta capacidad antioxidante. De nuevo, el aceite de tomillo es uno de los aceites esenciales con mayor actividad antioxidante. Youdim y Deans (1999) observaron que la suplementación del aceite esencial de *Thymus vulgaris L*. en la dieta de ratas disminuyó la capacidad oxidante enzimática en corazón e hígado. El extracto de clavo, otro de los aceites esenciales con mayor actividad, y sus principales compuestos, eugenol y acetato de eugenil, mostraron una actividad antioxidante comparable al antioxidante natural -tocoferol, vitamina E (Lee & Shibamoto, 2001).

El D-limoneno es el monoterpeno monocíclico más abundante en el aceite esencial de los cítricos. Este principio activo posee la capacidad de inhibir el desarrollo de tumores espontáneos o provocados en roedores. Udeon et al (1999) demostraron que la administración oral de limoneno inhibió la carcinogénesis gástrica de las ratas tratadas. Existen otros compuestos naturales de plantas que poseen efectos protectores frente a la genotoxicidad y la carcinogénesis. La ingestión en la dieta de compuestos quimiopreventivos es una estrategia efectiva para minimizar los efectos nocivos de genotoxinas y carcinógenos. El geranitol, monoterpenos del aceite esencial de limoncillo o lemongrás, se presenta como una nueva clase de agentes para la quimio prevención. El geraniol inhibió el crecimiento de las células tumorales del cáncer de colon humano (Carnesecchi & Schneider, 2001). También el eugenol es conocido como un potente inhibidor de la peroxidación lipídica y puede poseer propiedades anticarcinogénicas y antimutagénicas. Abraham (2001) demostró el efecto antigenotóxico del pretratamiento con eugenol en ratones, inhibiendo la mutagénesis provocada por la aflatoxina B1.

Cuadro 1. .Efecto antibacteriano de aceites esenciales y principios activos.

Aceite Esencial	Compuesto	Microorganismo	Referencia
Clavo, canela, tomillo, oregano, naranja.	Eugenol	*L.innocua,* *L.monocytogenes* *B.cereus* *C.botulinum* *B.subtilis* *E.coli* *S. cerevisiae*	(Gomez, Lopez, Lopez, Gomez, & Montero, 2010) (Chaibi, Ababouch, Belasry, & Busta, 1997)
Canela, clavo	Timol + (nisina) Carvacrol; timol	*B. subtilis* *Escherichia*	(Seyed, Masoud, & Seyed, 2010)

Aceite Esencial	Compuesto	Microorganismo	Referencia
	Cinnamic; Eugenol	*coliListeria monocytogenes* *Lactobacillus platarum* *Pseudomonas fluorescens*	(Evans & Martin, 2000)
Orégano Menta	Eugenol	*Bacillus cereus* *Escherichia coli* *Salmonella enteritidis* *P. aeruginosa* *Staphylococcus aureus*	(Pelissari, Grossmann, Yamashita, & Pineda, 2009)
Oliva, romero, cebolla Pimienta, arándano, ajo, Orégano y orégano con	carvacrol 5%	*Listeria monocytogenes*	(Ponce, Roura, & Moreira, 2008)
Orégano	Carvacrol Cinnamaldehido	*Escherichia coli*	(Rojas, Avena, Olsen, Friedman, & Henika, 2007)
Tomillo	Carvacrol Timol	*B.cereus* *B.megaterium* *B.subtilus* *E.coli* *K.pneumoniae* *L.monocytogenes* *M.luteus* *M.smegmatis* *P.vulgaris* *P.aeruginosa* *S.aureus*	(Karaman, Digrak, Ravid, & Ilcim, 2001)

Cuadro 1. (Continuación) Efecto antibacteriano de aceites esenciales y principios activos.

1.9 Susceptibilidad de las bacterias Gram negativas y positivas

La mayoría de los estudios han observado que los aceites esenciales tienen una mayor actividad frente a las bacterias Gram positivas que frente a las Gram negativas (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001). Las bacterias Gram positivas sólo tienen una membrana, la membrana citoplasmática. Por el contrario, las bacterias Gram negativas tienen una membrana externa de fosfolípidos y lipopolisacáridos, además de la membrana citoplasmática.

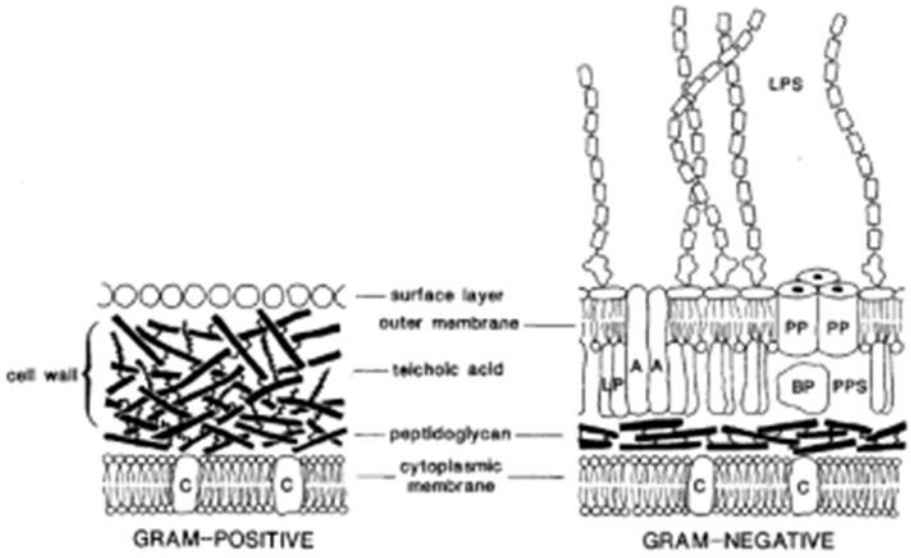


Figura 2. Esquema de las membranas celulares de las bacterias Gram positivas y negativas: LPS, lipopolisacáridos; PP, poros; C, membrana citoplasmática y proteínas; BP, proteínas; PPs, espacio periplásmico; A, proteínas de membrana externa; LP, lipoproteínas. Fuente: *(Sikkema & Poolman, 1995).*

Las bacterias Gram negativas son menos susceptibles a la acción antibacteriana ya que poseen una membrana externa alrededor de la pared celular, lo que restringe la difusión de los compuestos hidrofóbicos a través de su cobertura de lipopolisacáridos (Sikkema & Poolman, 1995). A pesar de la presencia de los poros de baja especificidad, la membrana externa tiene una permeabilidad muy baja hacia los compuestos hidrofóbicos, debido a los lipopolisacáridos lipofílicos. Sin embargo, no todos los estudios demuestran que las bacterias gran positivas sean más susceptibles, ya que existen compuestos lipofílicos que penetran a través de la membrana externa de algunas bacterias. Dorman y Deans (2000) observaron que las bacterias gran positivas fueron más susceptibles que las bacterias gran negativas al aceite esencial de *Pelargonium graveolens* (geranio) y *Thymus vulgaris* (tomillo), e igualmente sensibles a los aceites esenciales de *Piper nigrum* (pimienta), *Syzygium aromaticum* (clavo), *Myristiga fragrans* (nuez mozcada) y *Origanum vulgare* (orégano), Smith et al (1998) también observaron que las dos bacterias Gram positivas, *S. aureus* y *L. monocytogenes*, fueron más sensibles a la inhibición de los aceites esenciales que las tres bacterias Gram negativas, *E. coli*, *S. enteritidis* y *C. jejuni*. Sin embargo Inouye et al (2001), observaron un alto grado de susceptibilidad de H. influenzae (bacteria Gram negativa) hacia los aceites esenciales. Parece ser que la membrana externa no es totalmente impermeable a las moléculas hidrofóbicas, ya que algunas pueden atravesar lentamente sus poros (Helander & Alakomi, 1998). El mecanismo de acción de los aceites esenciales sobre las bacterias Gram negativas, y observaron que el timol y el carvacrol inhibían el crecimiento bacteriano atravesando la membrana externa de la bacteria e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática. Esto sugiere que la toxicidad de los aceites esenciales sobre las bacterias Gram negativas radique en el bajo peso molecular de los compuestos lipofílicos o hidrofóbicos. A pesar de su limitada solubilidad en agua, estos compuestos son capaces de penetrar dentro de las bacterias Gram negativas e influir en su proliferación y patogenicidad.

1.10 Mecanismo de acción de los compuestos activos de los aceites esenciales

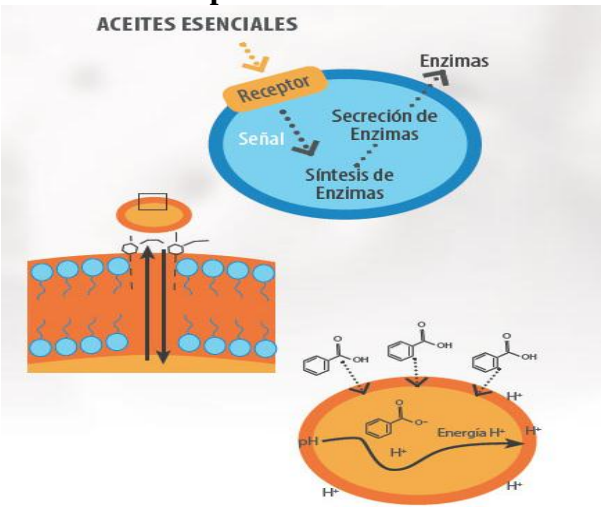


Figura 3. Localización y mecanismos de acción de los componentes de los aceites esenciales sobre la célula bacteriana: degradación de la pared cellular *(Helander & Alakomi, 1998)* de la membrana citoplasmática *(Uter & Schnuch, 2001)*; daño de las proteínas de membrana (Juven et al., 1994; Ultee et al., 1999); salida de contenido celular Lambert et al *(2001)*, coagulación del citoplasma e inhibición de la fuerza motriz de protones.

Los aceites esenciales y sus compuestos son activos frente a una amplia variedad de bacterias, incluidas las Gram negativas. Considerando la gran cantidad de compuestos químicos de diferentes grupos que podemos encontrar en los aceites esenciales, es evidente que la actividad antibacteriana no se atribuye únicamente a un mecanismo de acción específico, sino a varios mecanismos. Estos mecanismos son consecuencia de la acción de los aceites esenciales en varios puntos de la célula (Burt, 2004).

Una característica importante de los aceites esenciales y de sus componentes es la hidrofobicidad, la cual les permite unirse a los lípidos de la membrana celular y mitocondrial, deshaciendo su estructura y provocando un aumento de su permeabilidad, dejando salir contenido celular Sikkema et al (1995); Helander et al (1998) Ultee et al (2002) observaron una dilatación de la membrana del patógeno Bacillus cereus debido a la mayor fluidez de los lípidos de membrana como consecuencia de la interacción de la molécula de carvacrol, principio activo de los aceites esenciales del limón, tomillo, entre otros, con los lípidos de membrana. La dilatación de la membrana citoplasmática provocó su desestabilización. Parece ser que la localización y el número de grupos hidroxilo (-OH) sobre el grupo fenol de estas moléculas está relacionado con su toxicidad: una mayor hidroxilación es responsable de una mayor capacidad bactericida. Ultee et al (2002), sugirieron que la presencia del grupo hidroxilo en la molécula de carvacrol, al igual que en el timol, provoca la entrada de protones y el escape de iones potasio, la disminución del gradiente de pH, el incremento del gasto de ATP y, finalmente, la muerte celular del patógeno *Bacillus cereus.*

La estructura química de los compuestos de los aceites esenciales determina el mecanismo de acción y la capacidad antimicrobiana. Algunos estudios han confirmado la importancia del grupo hidroxilo y su localización en la estructura fenólica para obtener una mayor capacidad antimicrobiana Dorman y Deans (2000); Ultee et al. (2002). Así, los fenoles timol y carvacrol, seguidos por el eugenol, fueron los compuestos con mayor actividad antifúngica. Balasundram et al (2005), también demostraron la importancia de la posición del grupo funcional en el anillo aromático de los compuestos, estudiando la capacidad antifúngica de 22 compuestos de aceites esenciales, 14 de ellos compuestos fenólicos. El mecanismo de toxicidad fenólica frente a los hongos se basa en la inhibición de enzimas fúngicos, posiblemente a través de reacciones con un grupo sufidrilo o a través de interacciones no específicas con proteínas (Cowan, 1999). Dorman y Deans (2000) también observaron que el carvacrol y el timol actuaban de forma diferente frente a especies bacterias Gram negativas y positivas.

1.11 Metabolitos secundarios en *Citrus sp.*

Las plantas del género Citrus han sido muy estudiadas para el control de microorganismos, encontrando que inhiben el crecimiento de varias especies de hongos Viuda et al (2008). Esto se debe a que producen varios metabolitos secundarios en los frutos y hojas, incluyendo alcaloides, terpenos, fenoles, flavonoides, taninos y saponinas Kuate et al (2006).

Cítricos comunes como la naranja (*Citrus sinensis*), la toronja (*Citrus maxima*) y la mandarina (*Citrus reticulata*), tienen una gran cantidad de metabolitos secundarios en la cáscara y en las semillas, los cuales tienen actividad antifúngica Okwu et al (2007). Un ejemplo son las flavonas metoxiladas, casi exclusivas de los cítricos, como son la nobiletina, sinensetina, tangeretina, quercetogetina y heptametoxiflavona, las cuales son más efectivas como sustancias antifúngicas que los demás flavonoides presentes en la cáscara de los cítricos. Esto se debe a que las flavonas metoxiladas no presentan glicosilaciones y tienen el grupo metoxilo en su estructura. Todos estos compuestos hacen que los cítricos tengan un gran potencial como fuente metabolitos secundarios para usarlos por la industria agropecuaria en el desarrollo de biopesticidas (Lu, Zhang, Bucheli, & Wei, 2006).

1.12 Citrus paradisi.

1.12.1 Clasificación sistemática

La muestra vegetal fue clasificada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, teniendo la siguiente clasificación taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

División: MAGNOLIOPHYTA
Clase: MAGNOLIOPSIDA
Subclase: ROSIDAE
Orden: SAPINDALES
Familia: RUTACEAE
Género: *Citrus*
Especie: *Citrus x paradisi Macfad.*
Nombre vulgar: “toronja”. (Padrón & Rocha, 2007)

1.12.2 Descripción y características morfológicas.

Citrus paradisi es un árbol cuyo tronco es corto y de copa compacta, brotes color púrpura y pocas espinas. Las hojas son de tamaño intermedio, algo vellosas, con alas grandes, nervios muy marcados y olor típico. Las flores son grandes y color verdoso, tiene estambres reducidos. El fruto es un hesperidio de forma globular achatada de color amarillo claro y de grandes dimensiones, puede alcanzar un diámetro de 15 cm a 20 cm. Consta de exocarpo (flavedo: presenta vesículas que contienen aceites esenciales), mesocarpio (albedo: pomposo y de color blanco) grueso y endocarpo (pulpa: presenta tricomas con jugo) blanco, rosa o rojo (Macías, 2014).

1.12.3 Distribución y hábitat.

El género *Citrus* tuvo su centro de origen en los trópicos y subtrópicos del este de Asia y del Archipiélago Indomalayo (China, Butan, Burma y Malasia), lugares en los cuales su cultivo comenzó hace miles de años. En el siglo XVI, desde España se trajeron cítricos al Perú, donde se inició su cultivo en el valle del Rimac y valles más al norte. En el Perú, se distribuye en la Costa y Selva Central del país, puede encontrarse en departamentos como Ica y Lima (UNI, 2010).

1.12.4 Uso y propiedades.

Es utilizada como ingrediente de cosméticos, jabones y detergentes; de la cáscara se extrae aceites esenciales muy utilizados en la perfumería; además de ser considerado un insecticida idóneo Gupta et al (2011).
Se le atribuye propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales, astringentes y conservantes. La toronja también ha sido utilizada en la prevención del cáncer, regeneración celular, reducción del colesterol, desintoxicación, mantenimiento de la salud del corazón, lupus, nefritis, artritis reumatoide y pérdida de peso.
Los cítricos son plantas que han sido muy estudiadas, razón por la cual se han empleado para fabricar varios productos comerciales como el extracto de semilla de pomelo o toronja (GSE) elaborado a partir de *Citrus paradisi* Viuda et al (2008).

1.12.5 Citrus reticulata.

1.12.6 Clasificación sistemática

Son árboles pequeños, hojas unifoliadas, pecíolos con pequeñas alas y articulados con la vaina de la hoja; las flores son de color blanca, simples y ubicadas en las axilas de las hojas, ovario generalmente de 10 a 14 partes; el fruto es un tipo especial de baya (hesperidio), las semillas pueden ser monoembriónicas y poliembriónicas; la raíz pivotante con muchas raíces secundarias.

Reino: PLANTAE

División: MAGNOLIOPHYTA
Clase: MAGNOLIOPSIDA
Orden: SAPINDALES
Familia: RUTACEAE, CITROIDEAE
Tribu: *Citreae*
Género: *Citrus*
Especie: *C. reticulata* (Cáceres, 1996).

1.12.7 Hábitat.

Nativos del sudeste asiático; ampliamente cultivado en forma comercial en los trópicos y subtrópicos de ambos hemisferios.

1.12.8 Uso y propiedades.

Citrus reticulata se han reportado que poseen características antifúngicas, antimicrobianas y fitoterapéuticas, las cuales le hacen una especie promisoria para su uso en actividades farmacéuticas, control de plagas en el sector agrícola y la preservación de los alimentos para evitar la proliferación de microorganismos causantes de enfermedades (Carrillo, 1999).
Estudios antibacterianos demuestran que el aceite esencial de mandarina es activo contra *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Helicobacter pilori y Salmonella.* El aceite esencial de hojas tiene actividad fungicida contra *Colletotrichum acutatum* causante de la caída prematura del fruto. Estudios farmacológicos demuestran que la decocción del fruto tiene actividad antihemorragica sobre el sistema gastrointestinal, muestra efecto de relajación sobre el útero de rata y efecto espasmolítico de ileon de cobayo (Cáceres, 1996).

1.13 Condiciones óptimas para desarrollar la capacidad antibacteriana de los aceites esenciales y sus compuestos

La propiedad antimicrobiana de los aceites esenciales pueden potenciarse si las condiciones del medio son adecuadas para que el mecanismo de acción pueda actuar.

La capacidad antibacteriana del aceite de tomillo y del timol era mayor a pH 5.5 comparada con la actividad del aceite a un pH 6.5. Parece ser que a un pH bajo, la molécula de timol está mayoritariamente no disociada, por lo tanto es más hidrofóbica, y puede unirse mejor a las regiones hidrofóbicas de las proteínas de membrana y disolverse mejor en la fase lipídica de la membrana bacteriana. Sin embargo, esta característica afectaría negativamente a su actividad frente a bacterias Gram negativas...

La efectividad de los aceites esenciales no sólo se ve modificada por la presencia de oxígeno o el pH del medio, sino que también depende de la temperatura. Algunos aceites esenciales pierden su capacidad antimicrobiana a temperaturas de refrigeración. Se cree que la temperatura no permite la penetración del aceite en la célula bacteriana, aunque el aceite de tomillo mantiene su capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano a 4ºC (Smith, Stewart, & Fyfe, 1998).

1.14 Aspectos legales del uso de los aceites esenciales y sus compuestos

La mayoría de los aceites esenciales y sus compuestos se clasifican como aditivos alimentarios GRAS (Generally Recognized As Safe; 21 CFR 182). En Estados Unidos, la Agencia Norteamericana para la regulación de Alimentos y Fármacos (Food and Drug Administration, FDA) (FDA, 2017) posee una lista de sustancias (Everything Added to Food in US, EAFUS; donde aparecen las sustancias GRAS, consideradas como sustancias seguras.

Estos aceites esenciales y sus compuestos están registrados por la Comisión Europea como saborizantes en alimentación. Los saborizantes registrados no presentan ningún riesgo para la salud del consumidor, y entre ellos podemos encontrar al timol, carvacrol, eugenol, limoneno, mentol, cinamaldehido, carvone y p-cymene Burt et al (2004).

Además, existen asociaciones como la Federación Europea de Aceites Esenciales (European Federation of Esential Oils, EFEO) (2017), creada en Junio del 2002 por asociaciones nacionales de países europeos (entre ellos España) que representa a compañías relacionadas con la producción y comercialización de aceites esenciales y sus materias primas, con el objetivo de informar, proteger y promover la producción de los aceites esenciales.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de dos productos naturales a base de extractos de cítricos como alternativa de reemplazo del triclosán en jabones antibacteriales.

2.2. Objetivos Específicos

Determinar la mínima concentración inhibitoria y estabilidad para los extractos cítricos y triclosán frente a los microrganismos *E.coli, B.cereus, S. aureus, P.aeruginosa Cándida sp y A.niger.*

Comparar la acción bactericida de los extractos cítricos y triclosán mediante las técnicas de Kelsey Maurer y Kirby-Bauer frente a los microorganismos evaluados.

Valorar la efectividad antibacterial del jabón con extractos cítricos contra el triclosán en manos del personal que labora en Protécnica Ingeniería mediante 5 análisis microbianos.

3. METODOLOGÍA

3.1. Diseño de la investigación

Se realizó el trabajo de tipo experimental, para el análisis del lavado de manos se usó el análisis estadístico *MANOVA* ya que, para los resultados del experimento se midió la efectividad de las bacterias (*S.aureus*, *E. coli*, Aerobios Mesófilos y Mohos-levaduras.), teniendo en cuenta los factores de tipo de área (A1, A2, A3) y el Jabón con el activo antimicrobiano (P1, P2, P3). El factor Área indica que es estadísticamente significativo tan solo con la prueba *Lawley-Hotelling*, con un nivel de confianza del 95%, en la medición de los microorganismos (*S.aureus, E.coli*, Aerobios Mesófilos, Mohos y levaduras), del mismo modo se hace para el factor Producto.

3.2. Población de estudio y muestra

La población objeto de este estudio fueron 27 personas que se encontraban en tres áreas diferentes de la compañía (Administrativa, laboratorios y operativa).

El presente trabajo de grado fue realizado en el Laboratorio de Microbiología de Protécnica ingeniería, Arroyohondo – Yumbo, Valle del Cauca.

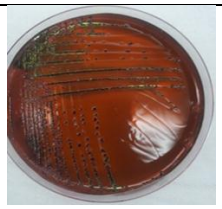
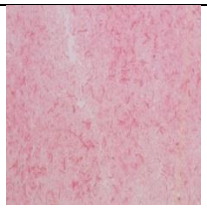
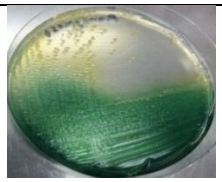
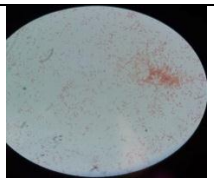
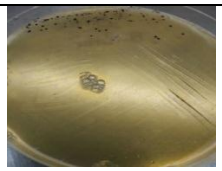
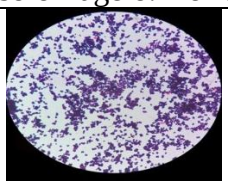
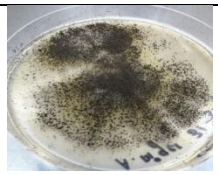
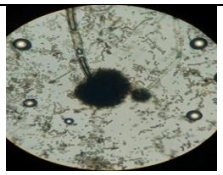
3.3. Microorganismos

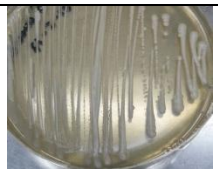
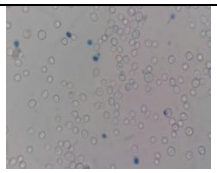
Los microorganismos empleados en cada una de las técnicas provienen de cultivos liofilizados (Lyfocults) reconocidos por las colecciones de la American Type Culture Collection (ATCC) organización privada sin ánimo de lucro dedicada a la recolección, conservación y distribución de los cultivos auténticos de microorganismos existentes, virus, DNA, plantas, células de animales y el hombre.

Los cultivos fueron transferidos a cajas de Petri con agar nutritivo para ser preservadas. La conservación consistía en repiques mensuales a un agar nutritivo (Agar tripticasa de soya TSA, BD).

Cuadro 2. La identificación de los microorganismos se confirmó mediante coloración de Gram, y siembra en agares selectivos.

MICROORGANISMO	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
Bacillus cereus 13061	Colonias en medio Plate Count, grandes, de borde irregular, color crema.	Bacilos Gram positivos, esporulados.

MICROORGANISMO	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
Escherichia coli 25922	 Colonias en agar EMB (Eosina y azul de metileno) tienen de 2 a 4mm de diámetro, un centro grande de color oscuro negro y tienen brillo verde metálico a luz reflejada.	 Objetivo: 100X Bacilo Gram negativa, no forma esporas, móviles (flagelos peritricos).
Pseudomona aeruginosa 9027	 Colonias en agar cetrimide son grandes, rugosas, mucoides de color Amarillo a verdoso.	 Objetivo: 100X Bacilo curvo Gram negativa, aislado o en parejas poseen un solo flagelo. No forma esporas.
Sthapylococcus aureus 25923	 Colonias lisas, levemente elevadas, de bordes enteros, pigmentadas de color negro por el medio Baird Parker por la capacidad de reducir el telurito a telurio y detector la lecitinasa.	 Objetivo: 100X Cocos Gram positivos, tienden a agruparse en racimos. Tienen una forma esférica.
Aspergillus niger 9448	 Hongo filamentoso, colonias de color blanco – amarillento en medio CGA y con abundantes puntos negros. El reverse se observe de color crema.	 Objetivo: 40X Micelio septado, hialino, presenta cabezas aspergialares, con conidios redondos

MICROORGANISMO	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
		equinulados y negros. El conidioforo es largo.
Candida sp 44112	 Colonias lisas en medio CGA, opacas de color blanco a beige, con borde irregular.	 Objetivo 40X Blastoconidiass de diferentes tamaños, redondas y gemantes.

Cuadro 2. (Continuación) La identificación de los microorganismos se confirmó mediante coloración de Gram, y siembra en agares selectivos.

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 3. Características de los productos a evaluar.

Propiedades fisicoquímicas	Extracto 1	Extracto 2	Triclosán
Ingrediente activo	Aceites esenciales de *Citrus parasidi* y *Citrus reticulata*. Ácido ascórbico y ácido cítrico.	Terpenos cítricos y ácidos orgánicos	Phenol5-chloro-2-(2,4-clichloroph enoxy)
Apariencia	Líquido viscoso	Líquido translúcido	Polvo cristalino
Color	Verde translúcido	Incoloro	Blanco a crema
Olor	Característico a cítrico	Ligeramente picante	Ligerament e aromático
Densidad (g/cm^3)	1.13 – 1.17	0.99 – 1.01	No disponible
pH directo	1.5 – 2.0	2.9 – 3.1	No disponible
Solubilidad en agua	Totalmente soluble	Totalmente soluble	10 mg/L a 20°C
Casa comercial	Privado	Privado	Proquem USA. Fabricador: China.

Fuente: Elaboración propia con base en la información contenida en las Fichas técnicas de los productos (documento interno)

3.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria CMI y su estabilidad en el tiempo de cada uno de los productos a evaluar (instructivo código i-mb-6, basado en NTC 2455. Desinfectantes)

3.4.1. Preparación del inóculo.

Todos los microorganismos fueron sometidos a crecimiento en caldo nutritivo por 24 horas a 37 °C – 25ºC.

Se tomaron las placas con suspensión de microorganismos sembrados y se transfirieron a tubos tapa rosca con solución salina al 0.8%, y se comparó la escala de MacFarland 0.5.

3.4.2. Acondicionamiento de los jabones con los activos puros.

El área de aplicaciones y cosméticos de la compañía aportó un jabón base traslucido, (ver Anexo 13), se colocaron 4 recipientes de plásticos, debidamente marcados, se adicionó 300 ml del jabón base, y los activos antimicrobianos a evaluar.

Los 4 recipientes con el jabón y el activo fueron los que se utilizaron para la estabilidad en la cámara, a 40º C, del laboratorio de aplicaciones y cosméticos. (Ver Anexo 2).

3.4.3. Preparación de la muestra.

Se colocó una fila de 8 tubos en una gradilla y en cada tubo se adicionó 2 ml del caldo nutritivo, y en el primer tubo se dispensaron 2.0 ml del jabón a analizar la cual equivale a un 50%, tomada de la concentración inicial, y a partir de este se transfirió 2 ml al segundo tubo de forma consecutiva para los otros. Este procedimiento se realizó para los tres jabones.

Se inoculó cada tubo de la fila (8 tubos) con 0.1 ml del inóculo bacteriano de los microorganismos preparados a una concentración de 0.5 de la escala de Macfarland.

3.4.4. Cálculos.

La concentración mínima inhibitoria se expresó en partes por millón y el resultado se reportó tomando el tubo inmediatamente posterior al cual hubo crecimiento de microorganismos (realizando la lectura de derecha a izquierda).

3.4.5. Determinación de la Concentración mínima bactericida CMB.

En cajas divididas en 4, se sembraron en medio Plate Count para bacterias y CGA para hongo los tubos que no se evidenció turbidez, para verificar si hay aún viabilidad de los microorganismos a evaluar.

3.5. Prueba para determinación de tiempo de contacto método de kelsey maurer (instructivo código i-mb-6, basado en ntc 5473. desinfectantes)

3.5.1. Suspensión bacteriana.

Se preparó una suspensión de cada una de las cepas a evaluar, en solución salina estéril (0.8%) hasta la obtención una turbidez igual a la del tubo No. 0.5 de la escala de MacFarland.

3.5.2. Determinación de la viabilidad.

Este procedimiento se utilizó para verificar la viabilidad de la cepa en estudio y conocer el recuento de UFC en el inóculo. Se preparó 6 diluciones en serie 1/10, con una suspensión bacteriana, utilizando como diluyente agua solución salina (8%). Luego, se sembró 1 ml de la dilución a analizar, por el método de profundidad y se vertió 15 ml de agar plate count a una temperatura de 45 °C, las cajas se mezclaron con movimientos de rotación en forma de ocho y una vez solidificado el agar, se incubo a 37°C por 24 horas. Finalmente se realizó recuento de colonias y al resultado se multiplico por el factor de dilución, lo que corresponde al inóculo bacteriano real.

Cuadro 4. Concentración inicial de los microorganismos a evaluar.

Microorganismos	**UFC/ml**		
	10^1	10^3	10^7
B. cereus	>1600	>1600	1,1E+07
S. aureus	>1600	>1600	1,4E+07
P.aeruginosa	>1600	>1600	5,0E+07
E.coli	>1600	>1600	1,3E+07
Mohos y Levaduras	>1600	>1600	1,3E+07

Fuente: Elaboración propia

3.5.3. Determinación de tiempo de contacto.

Para evaluar la efectividad de los activos se utilizaron las cantidades estándares: Extracto 1 (0.5%), Extracto 2 (0.5%), Triclosán (0.3%). En un recipiente estéril se colocaron 9 ml de cada uno de los activos y 1.0 ml de suspensión bacteriana, se dejaron actuar durante 30, 60, y 90 segundos. Después de los tiempos de exposición se realizaron 3 diluciones en base 10 y se sembró por placa invertida para verificar la acción de los activos y calcular las unidades formadoras de colonias/ml teniendo en cuenta el factor de dilución; este proceso confirmó a que tiempo de exposición se destruyen completamente los microorganismos, o se impide el crecimiento microbiano (ver Anexo 3).

3.5.4. Preparación de los activos antimicrobianos

Para realizar el estudio de los activos antimicrobianos extracto 1, 2 y triclosán se prepararon cantidades patrones para ser utilizadas en los procedimientos, como activo puro, adición en el jabón de estabilidad y lavado de manos.

Cuadro 5. Concentraciones de activos antimicrobianos estándares para el estudio.

Activo	**Concentraciones**
Extracto 1	0.5 % de extracto en 99.5 ml Agua estéril.
Extracto 2	0.5% de extracto en 99.5ml Agua estéril.
Triclosán	0.3% de Triclosán en 60/40 Propenglicol/ Agua estéril, 99.7 ml de la solución.

Fuente:
Elaboración propia

3.5.5. Determinación de la efectividad.

Para recolectar la información se emplearon los parámetros establecidos por la norma técnica colombiana 5473 a partir de la cual se tuvo en cuenta los procedimientos experimentales para la determinación de la actividad bactericida de los activos empleados.

Al menos una concentración debe demostrar un LOG R ≥ 5 y al menos una concentración debe demostrar un LOG R < 5.

3.6. Técnica de susceptibilidad por disco en agar (Kirby-Bauer)

3.6.1. Preparación del inóculo.

Se tomaron inóculos de cada uno de los microorganismos de medios de cultivos no mayores a 24 horas, que se obtuvieron del aislamiento primario.
Se prepararon suspensiones de 9 ml de cada uno de los microorganismos en solución salina estéril teniendo en cuenta una concentración de 1 $x10^8$ UFC/mL la cual es equivalente al patrón 0.5 de la escala de McFarland (USP, 2014).

Para la preparación de las cantidades de los activos se utilizó agua purificada y recipientes estériles

3.6.2. Preparación de los discos.

Se prepararon los discos de papel filtro (Whatman No. 2) de 6mm de diámetro y se impregnaron con 8ul de activo a evaluar. Para cada activo se evaluaron cinco concentraciones las cuales correspondieron al 50%, 75%, 100% 125% y 150% de la MIC.

3.6.3. Siembra de la muestra.

Se sumergió un aplicador de algodón estéril, dentro de la suspensión del cultivo. El aplicador se colocó por encima del nivel del contenido del tubo y se froto contra las paredes del mismo para remover el exceso del inóculo. El inoculo se sembró uniformemente sobre la superficie del medio PCA y CGA con el aplicador. Se realizó esta siembra en tres direcciones. Se dejó que la superficie del medio sembrado se secara durante 10 minutos, manteniendo la caja con la tapa cerrada.

Se colocaron los discos sobre la superficie del agar con pinzas estériles; con estas, se presionaron los discos ligeramente sobre el agar para asegurar un contacto uniforme. Los discos se colocaron dejando entre disco y disco un espacio uniforme; para evitar que las zonas de inhibición quedaran imbricadas. Se llevaron a incubar las cajas inmediatamente a 35°C y 25º C (ver Anexo 4). La lectura de las cajas se realizó después de 24 horas de incubación.

Pasado el tiempo de incubación se midieron las zonas de inhibición de cada disco contra una superficie oscura bajo luz reflejada, por la complejidad de algunos halos. Medimos el diámetro de la zona incluyendo los 6mm del disco, con una regla sobre el respaldo de la caja Petri sin remover la tapa. La lectura de 6mm indica que no hay zona de inhibición. Se midió cada halo formado tomando el diámetro total menos el diámetro del disco.

3.7. Valoración de las condiciones higiénicas de las manos del personal de diferentes áreas de la compañía. (Villalobos & Mendoza, 2015)

3.7.1 Selección de los participantes del estudio. Según el decreto 8430 de 1993 de Ministerio de Salud. Capìtulo II De investigación Farmacologica.

Existen diferentes factores que influyen sobre el tipo de flora microbiana que puede estar presente en las manos, tales como el área donde se desarrollan las actividades diarias, el tipo de actividad que se realiza, la frecuencia en el lavado de las manos, etc.

Teniendo en cuenta lo anterior se consideró la inclusión de personal en tres áreas diferentes de la compañía (área administrativa, laboratorios y producción), en todos los casos los voluntarios debían cumplir con los siguientes criterios:

3.7.2 Criterios de inclusión:

- Sexo indiferente
- Edades que oscilan entre 18-50 años
- No presentar ningún tipo de heridas, irritación, infección o descamación en las manos.
- No presentar ningún tipo de alergia conocida a los componentes típicos de una formulación de jabón antibacterial.
- Afiliación a EPS

3.7.3 Criterios de exclusión:

- Presencia de cualquier enfermedad o patología cutánea en las manos
- Alergia a algunos de los componentes del producto en estudio
- Tener un tratamiento tópico para combatir problemas dermatológicos en las manos

3.7.4 Cantidad de voluntarios y Convocatoria

Con el fin de poder realizar un análisis estadístico, se consideró realizar la evaluación de cada activo antimicrobiano sobre 3 voluntarios por cada área de la compañía, lo cual corresponde a 9 voluntarios por activo evaluado para un total de 27 voluntarios.

Nota: Cada voluntario fue informado sobre los objetivos del estudio, la metodología y consentimiento. (Ver Anexo 17).

3.7.1. Microorganismos a evaluar.

Se utilizaron para el aislamiento de microrganismos totales; placas con agar PCA; placas con agar BP para el aislamiento e identificación presuntiva de *S. aureus*; placas con agar EMB para aislamiento de coliformes totales y fecales y placas con agar CGA para aislamiento de mohos y levadura.

3.7.2. Técnica de lavado de manos.

Se instruyó a los participantes tanto verbalmente como con el apoyo de un diagrama sobre la técnica social del lavado de manos, según la Word Health Organization 2009 (ver Anexo 5), que se describe brevemente a continuación. Antes de que se iniciara el lavado de manos, el personal se retiró de manos y muñecas, todos los artículos de joyería y se realizó el siguiente procedimiento: 0. Se abrió la llave del agua y se humedecieron las manos; 1. Se Aplicó en las

palmas de la manos 2 ml del jabón antibacterial cubriendo la superficie de las manos; 2. Friccionaron sus palmas de las manos entre sí; 3. Frotaron las palma de la mano derecha contra el dorso de la izquierda entrelazando los dedos y viceversa; 4. Frotaron las palmas de las manos entre sí, con los dedos entrelazados; 5. Frotaron el dorso de los dedos de una mano con la palma de la mano opuesta, agarrándose los dedos; 6. Frotaron con un movimiento de rotación el pulgar izquierdo atrapándolo con la palma de la mano derecha y viceversa; 7. Frotaron la punta de los dedos de la mano derecha contra la palma de la mano izquierda, haciendo un movimiento de rotación, y viceversa; 8. Se enjuagaron las manos con agua; 9. Secaron con una toalla de un solo uso; 10. Se sirvieron de la toalla para cerrar el grifo.

3.8 Método del hisopado.

El procedimiento se aplicó a 9 personas elegidas en las diferentes áreas de la compañía, entre quienes había personas diestras y zurdas, cuyas manos no estuviesen visiblemente sucias y que no hubiesen sido sometidas a un procedimiento de limpieza (lavado u aplicación de un antiséptico). Posteriormente, con la técnica de contacto directo y recuento en placa se hizo rodar un hisopo estéril humedecido con solución salina al 0.1%, en movimientos horizontales por toda la superficie de la palma seguido por movimientos verticales a lo largo de los dedos y contorno de la mano y finalmente alrededor de las uñas. Las muestras recolectadas se transfirieron a tubos con solución salina estéril, para la cuantificación directa y por dilución, respectivamente (Burton & Wilcke, 2001) (ver Anexo 6).

El porcentaje de efectividad se calculó así:

% de efectividad =

UFC Antes - UFC Después / UFC Antes *100

3.9 Toma de muestra patrón.

Inicialmente se realizó una prueba de funcionalidad, con el objeto de determinar si los productos a evaluar, es capaz de disminuir la carga microbiana presente en las manos de las personas, según la metodología descrita en Pouch, la mano derecha será consideró como la mano control (se muestreó antes de aplicar el tratamiento), y la mano izquierda será la mano de prueba. Se realizó con el jabón líquido (sin activo), jabón líquido (extracto) y jabón líquido (triclosán), con esto se determinó la diferencia de cada uno de los tres jabones, en la disminución del conteo inicial de bacterias presentes en las manos (Pouch, 2001).

3.9.1 Evaluación cuantitativa de la carga bacteriana en la superficie de la palma de la mano.

El hisopo con la muestra obtenida se colocaron en un tubo con 9mL de solución salina estéril, se mezclaron utilizando el vortex por 2min. Se realizaron 5 diluciones seriadas en base 10, para el control y 3 diluciones seriadas para el muestreo posterior al lavado de manos, se inocularon las diferentes diluciones en la superficie de los medios de cultivo, utilizando perlas de vidrio para dispersar la muestra en toda la superficie del agar. Las placas inoculadas se incubaron a 36°C por 24 h y a 25 ^{0}C por 72 horas mohos y levaduras.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de la efectividad de los activos en los jabones a través del tiempo mediante las técnicas concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima concentración bactericida (CMB).

En los resultados de esta prueba, la actividad antimicrobiana se apreció determinando la cantidad más pequeña del agente antimicrobiano que se necesitó para inhibir el crecimiento de los microorganismos habiendo transcurrido 90 días de estabilidad de los jabones antibacteriales con cada uno de los activos. Para los extractos 1 y 2, se trabajó a una concentración de 0.5 % de activos y para el triclosán 0.3%, en los jabones antibacteriales, ya que para definir esta dosis, se tomaron datos de las CMI, anteriores realizadas con los activos puros. (Ver Anexo

En la figura 4, se evidencia el comportamiento del microorganismo *S. aureus* frente a los jabones en estabilidad, arrojándonos que el triclosán desde el tiempo 0, necesita concentraciones mayores a 51419 ppm, con respecto a los extractos 1 y 2.

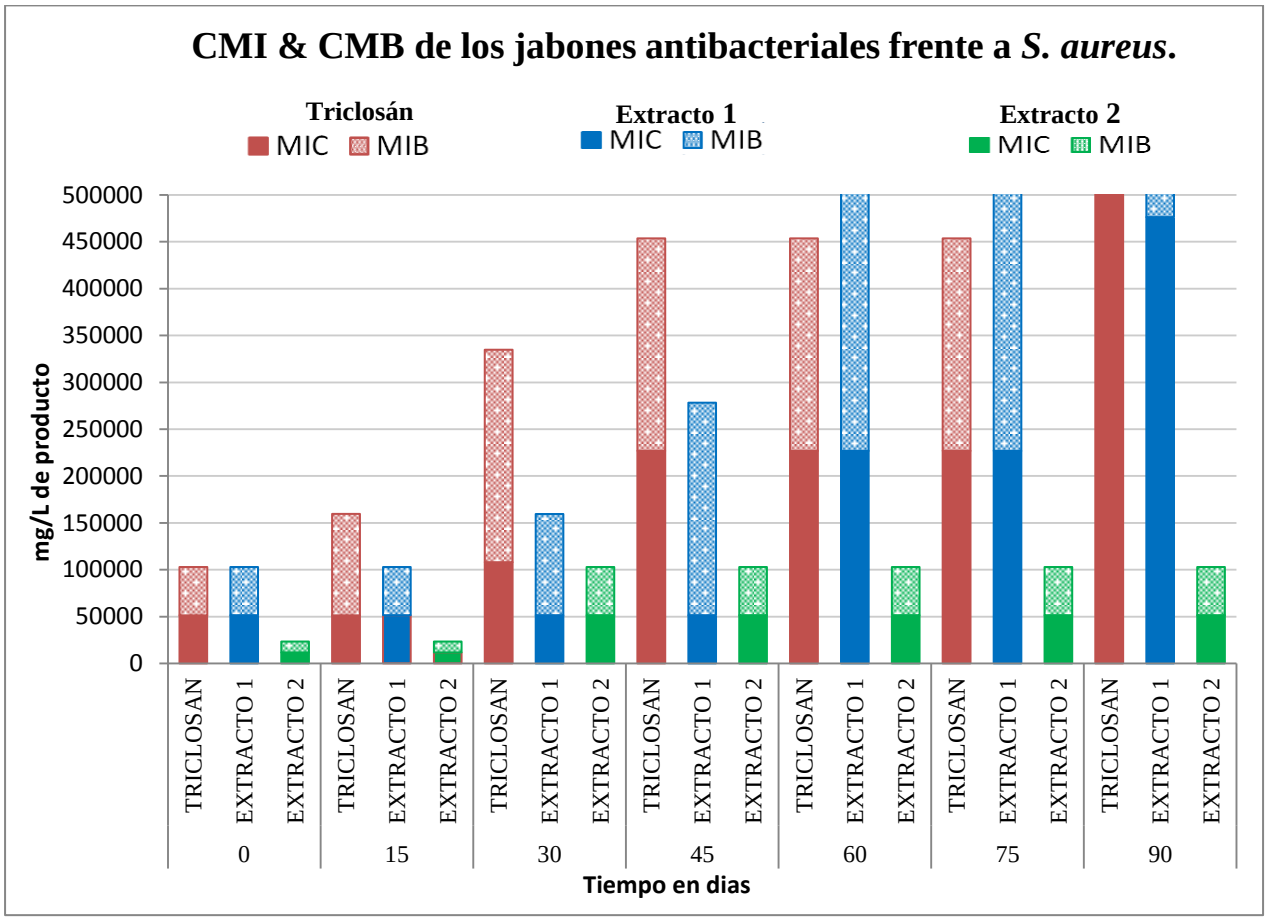


Figura 4. Mínima concentración inhibitoria y mínima concentración bactericida de los jabones con activos antibacteriales en estabilidad.

A media que transcurre el tiempo se puede observar que el triclosán supera los 500000 ppm, de la MIC, así mismo estudios de Suller and Russell (2000).

Como lo muestra la figura 5, el activo que logro estabilidad en el tiempo fue el Extracto 2, ya que no superó los 52000 ppm, para inhibir el crecimiento y obtener un efecto bactericida menores a los 12000 ppm. Con respecto al Extracto 1, que al cabo de los 60 días, fue perdiendo su acción inhibitoria y bactericida.

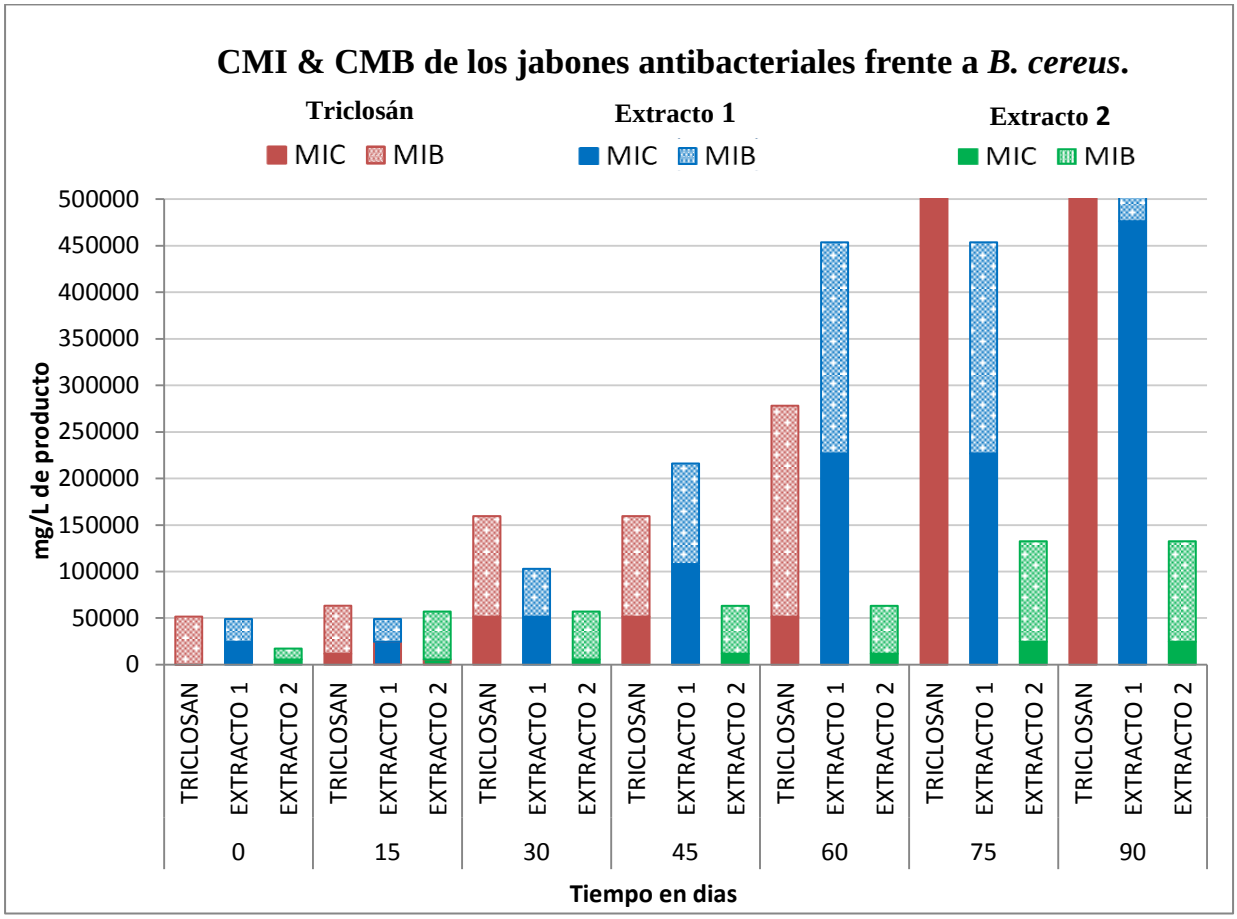


Figura 5. Mínima concentración inhibitoria y mínima concentración bactericida de los jabones con activos antibacteriales en estabilidad.

Con las concentraciones evaluadas de los activos antimicrobianos, se observó (Figura 5) que nuevamente triclosán pierde su efectividad a medida que transcurre el tiempo, en este caso contra *B.cereus*, perdiendo estabilidad en el día 75 requiriendo mayores concentraciones a 500000 ppm superando el valor de la CMI.

El extracto 2, no superó los 25000 ppm de concentración, siendo efectivo tanto en la inhibición como en la bactericida ya que no fue mayor a los 150000 ppm, forma precisa de matar el microorganismo. El extracto 1, va aumentando su concentración inhibitoria a los 60 días, siendo aun así mejor que el triclosán, ya que se ha demostrado particular actividad contra bacterias Gram positivas (Vischer & Regos, 2005).

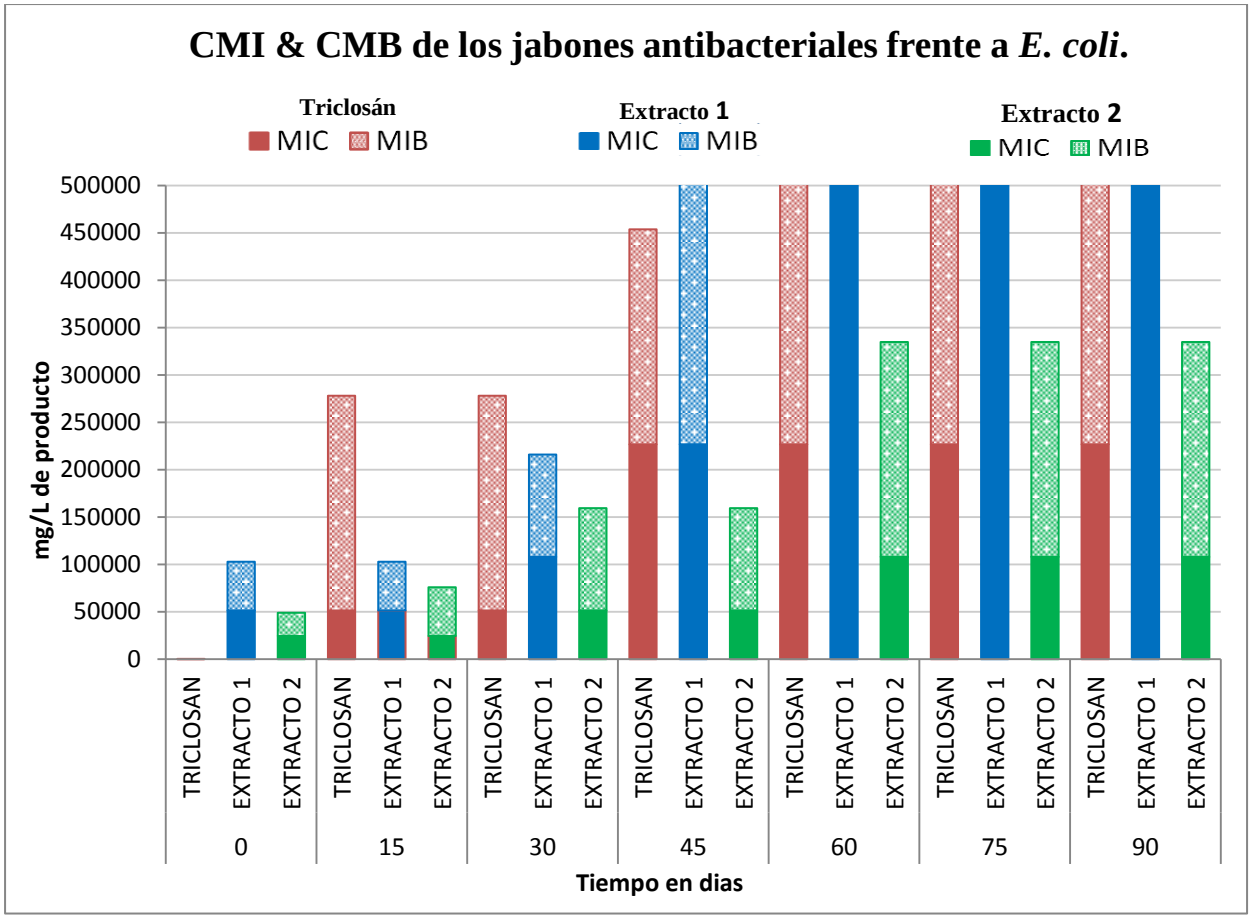


Figura 6. Mínima concentración inhibitoria y mínima concentración bactericida de los jabones con activos antibacteriales en estabilidad.

La inhibición frente a *E. coli*, que requirió mayor concentración inhibitoria para este caso fue el Extracto 1, donde a los 60 días supero los 500000 ppm, perdiendo su efecto bactericida en relación la concentración utilizada.

El triclosán, para este caso fue estable a medida del tiempo no superò los 250000 ppm, como potencial inhibitorio ya que con respecto a la concentración bactericida, al cabo de los 90 días supero la concentración de la CIM, en trabajo.

Con respecto a los anteriores el Extracto 2, sigue estable con respecto al tiempo, ya que su concentración inhibitoria se mantuvo en 107980 ppm y su efecto bactericida no mayor a 350000 ppm.

Las bacterias Gram negativas por lo general son más resistentes a los antisépticos y desinfectantes que las Gram positivas. Se han hecho estudios donde se midieron las concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) que presentan tanto las Gram positivas como las Gram negativas, y se estableció que hay diferencias marcadas entre *S.aureus* y *E. coli* a los compuestos de amonio cuaternario (CAC), hexaclorofeno, diamidinas y triclosán, pero poca diferencia en la susceptibilidad a la clorhexidina (Cabrera & Gomez, 2007).

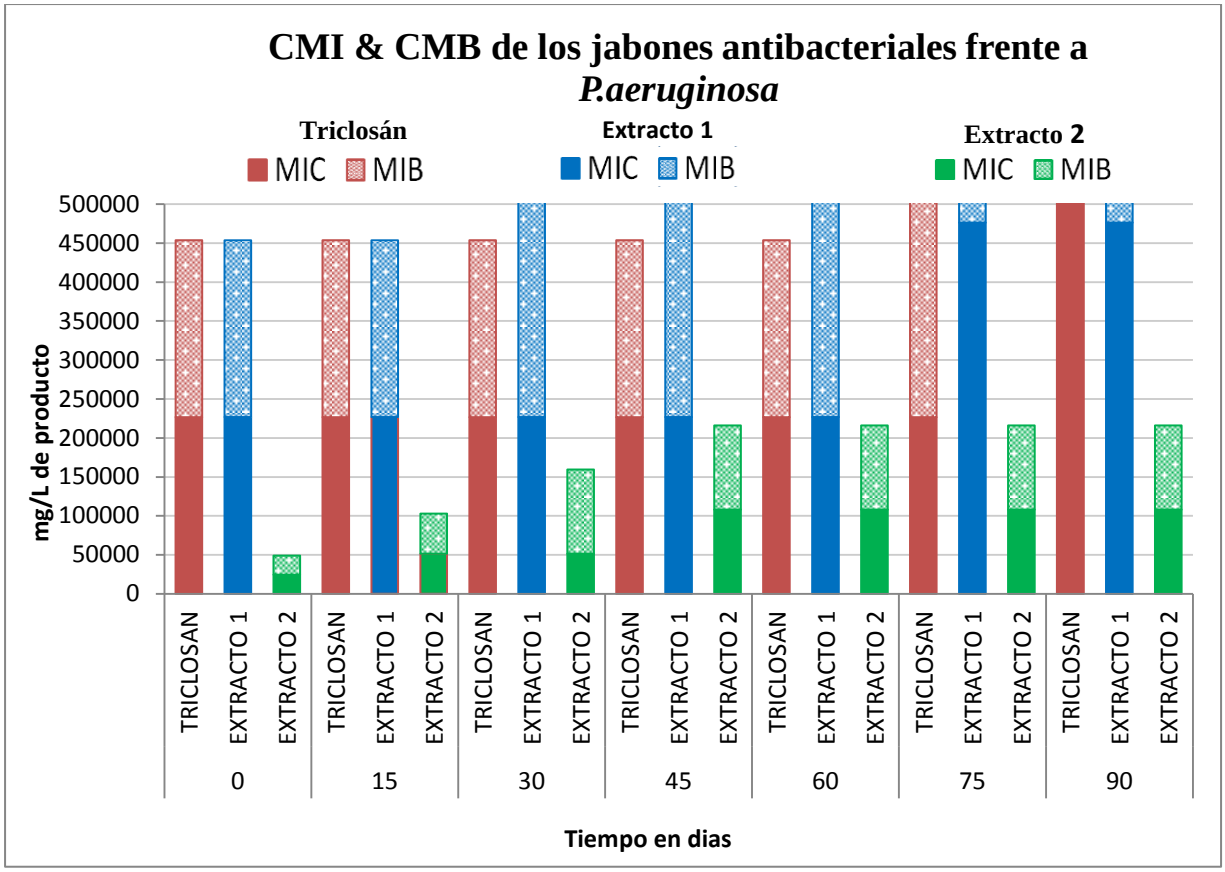


Figura 7. Mínima concentración inhibitoria y mínima concentración bactericida de los jabones con activos antibacteriales en estabilidad.

Con respecto a la estabilidad de la *P.aeruginosa*, los jabones con activos de triclosán como de extracto 1, hasta los 75 días mantuvieron su capacidad inhibitoria de 226757 ppm, perdiendo su efecto inhibitorio el extracto 1 con 476190 ppm, aun así no saliendo del rango de la cantidad utilizada en la CMI.

Con respecto a las bacterias evaluadas en la estabilidad de los activos en los jabones antibacteriales, el extracto 2, permanece su actividad antimicrobiana durante los días transcurridos en un rango no superior a 107980 ppm y 226757 ppm.

A pesar del contenido de cationes como el magnesio, que tiene *P.aeruginosa*, produce enlaces estables entre moléculas de LPS y como complemento a este mecanismo, esta bacteria presenta porinas pequeñas que impiden el paso por difusión de ciertas sustancias (Cabrera & Gomez, 2007), el comportamiento de esta bacterias frente a los activos no supero la cantidad de la CMI, con respecto a *E. coli* que es Gram negativa.

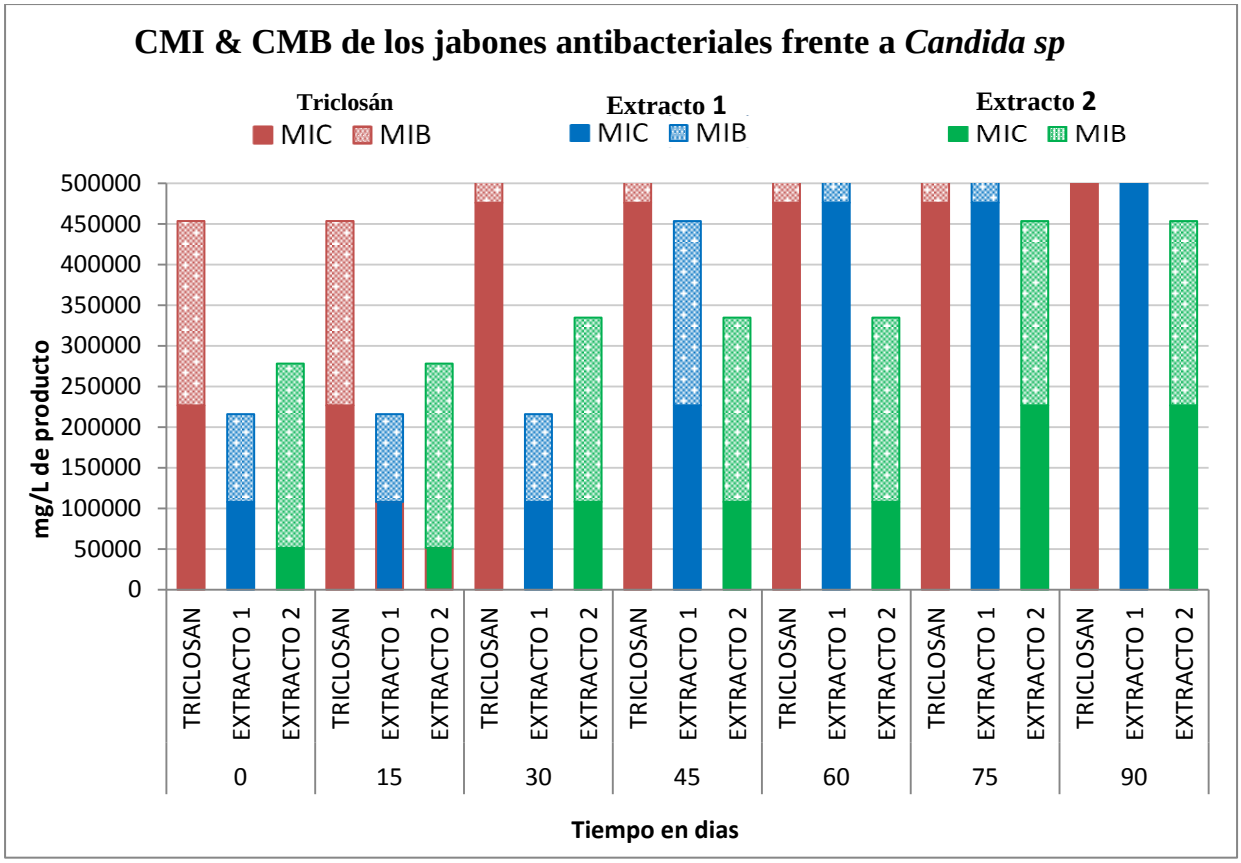


Figura 8. Mínima concentración inhibitoria y mínima concentración bactericida de los jabones con activos antibacteriales en estabilidad.

Como se puede apreciar en la figura 8, la estabilidad de los jabones antibacteriales frente a *Cándida sp*, el triclosán desde el tiempo 0, necesito concentraciones superiores de 226757 ppm, con respecto a los extractos 1 y 2 que fueron de 107980 y 51419, confirmándonos que el extracto 2, necesita menor cantidad de activo para obtener un efecto inhibitorio.

Con respecto a la concentración fungicida, tanto el extracto 1 y 2, fueron constantes durante los 45 días de estabilidad, en comparación con el triclosán que supero los rangos de efectividad. Al cabo de los 90 días, el extracto 1, perdió su efecto inhibitorio y bactericida.

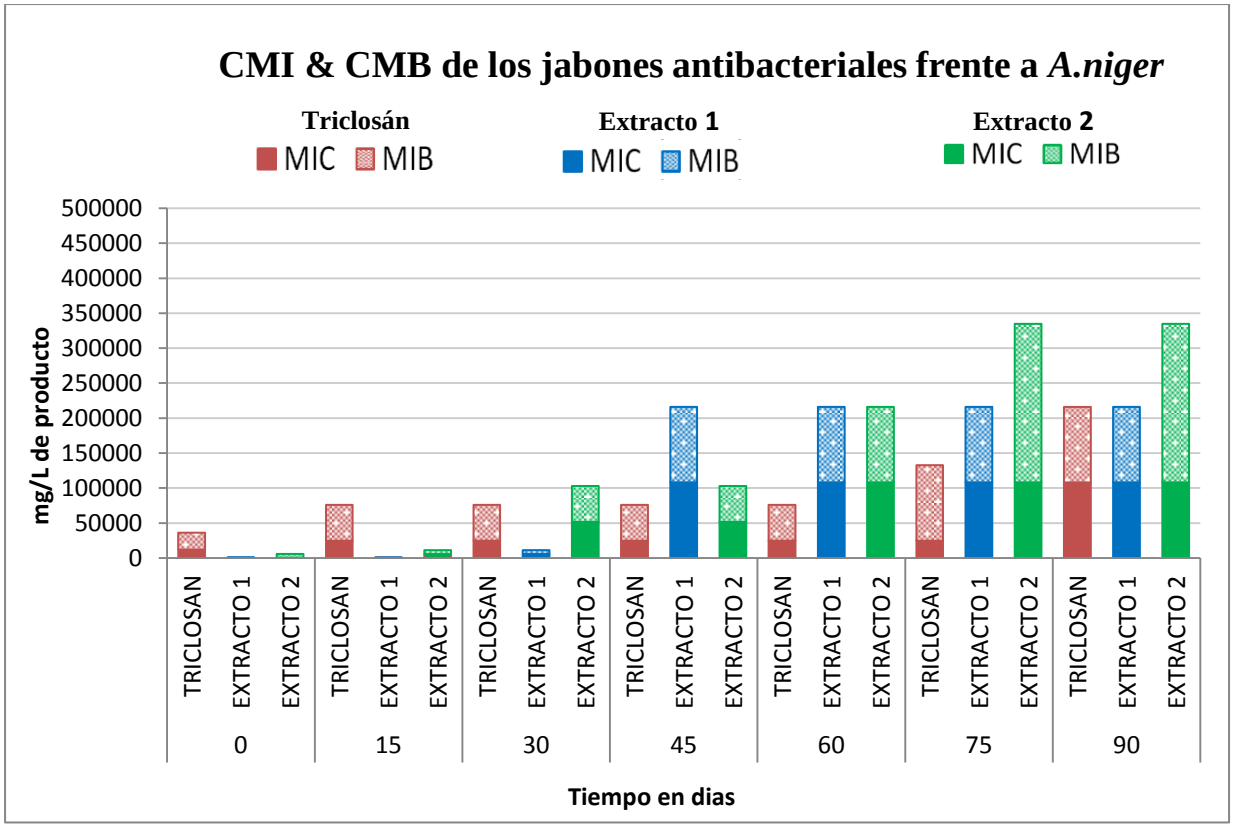


Figura 9. Mínima concentración inhibitoria y mínima concentración bactericida de los jabones con activos antibacteriales en estabilidad.

El comportamiento de los extractos cítricos 1 y 2 durante la estabilidad de los jabones frente a *A.niger* como se observa en la figura 9, disminuyeron su capacidad inhibitoria en relación al triclosán, ya que se puede observar que a los 60 días de estabilidad, el extracto 1 venia de una concentración menor a 200 ppm, donde junto con el extracto 2 alcanzaron concentraciones de 107980 ppm, rango que alcanzo el triclosán al cabo de los 90 días de estabilidad.

Con respecto la mínima concentración bactericida, el triclosán fue relevante ya que en relación con la CMI, no superó los 107980 ppm de concentración, en cambio el extracto 2, su funcionalidad frente a mohos necesitó 226757 ppm y 118777 ppm por encima del extracto 1.

Los hongos son generalmente más resistentes que las levaduras y considerablemente más resistentes que las bacterias no esporuladas. Aunque las esporas de los hongos son menos resistentes que las esporas bacterianas a los agentes biocidas. Estos organismos tienen dos mecanismos de resistencia, el primero es una resistencia intrínseca y el segundo una resistencia adquirida.

En la resistencia intrínseca la célula presenta una barrera para reducir la entrada de un agente antimicrobiano. También la edad de los cultivos influencia la resistencia a la sensibilidad hacia los desinfectantes, ya que la pared celular es mucho menos sensible en fase estacionaria que en fase logarítmica.

4.1. Comparación de la acción bactericida de los extractos cítricos y Triclosán mediante las técnicas de Kelsey Maurer y Kirby-Bauer frente a los microorganismos evaluados.

4.2.1 Tiempo de contacto de los activos puros antimicrobianos, mediante el Método de Kelsey Maurer (Instructivo código I-MB-6, Basado en NTC 5473)

Para esta prueba se evaluaron variables como tiempo de contacto, concentración de los activos puros y cepas microbianas.

Las condiciones experimentales establecidas por la norma NTC 5473 de 2007, se modificaron, en el tiempo de contacto para cada uno de los activos, fueron de 30 sg, 60 sg y 90 sg ya que para el uso del producto en planta es de 30 sg, según el promedio de lo que se demora una persona en el lavado de manos.

Para preparar la suspensiones de los microorganismos a analizar: *B.cereus* ATTC 13061 *P. aeruginosa* ATTC 9027 *S. aureus* ATTC 25923 *E.coli* ATTC 25922 *Cándida sp*. ATTC 44112 *A. niger* ATTC 944, se siguió el procedimiento a partir del patrón de McFarland, al realizar el recuento de cada uno de los tubos que contenía los microorganismos, este arrojó ufc de (10^7). Se verificó la viabilidad lo que permitió trabajar con esta suspensión y elaborar a partir de esta, la prueba. Tabla 4.

En otros estudios como el realizado por Espigares et al (2003), se recomienda ajustar espectrofotométricamente la densidad de las suspensiones bacterianas a 620 nm de longitud de onda, para obtener una absorbancia de 0.2 a 0.3 para bacilos Gramnegativos y de 0.3 a 0.4 para cocos Gram positivos, lo cual puede ser útil al momento de preparar una suspensión con un recuento comprendido entre 1 y $3x10^8$ UFC/ml. La cual no se realizó por falta de equipos.

La dilución de neutralización implicó el enfrentamiento de la suspensión bacteriana y el activo bajo condiciones estándar. En este estudio se utilizó caldo Letheen que es un medio altamente nutritivo compuesto por lecitina y tween 80, capaz de neutralizar o inhibir la acción de los componentes activos de los extractos y el triclosán.

En el ensayo se trabajaron tres réplicas de cada tiempo, y diluciones hasta 10^3, a la vez con el fin de obtener bajo las mismas circunstancias de ensayo resultados precisos. Los resultados de los recuentos de las ufc/ ml de cada uno de los medios específicos en la prueba se consignan en el Anexo 4.

Todas las cepas evaluadas presentaron crecimiento en los tiempos implementados. El triclosán fue el activo que presentó mayor reducción logarítmica en comparación con los extractos 1 y 2 (ver Figura 10).

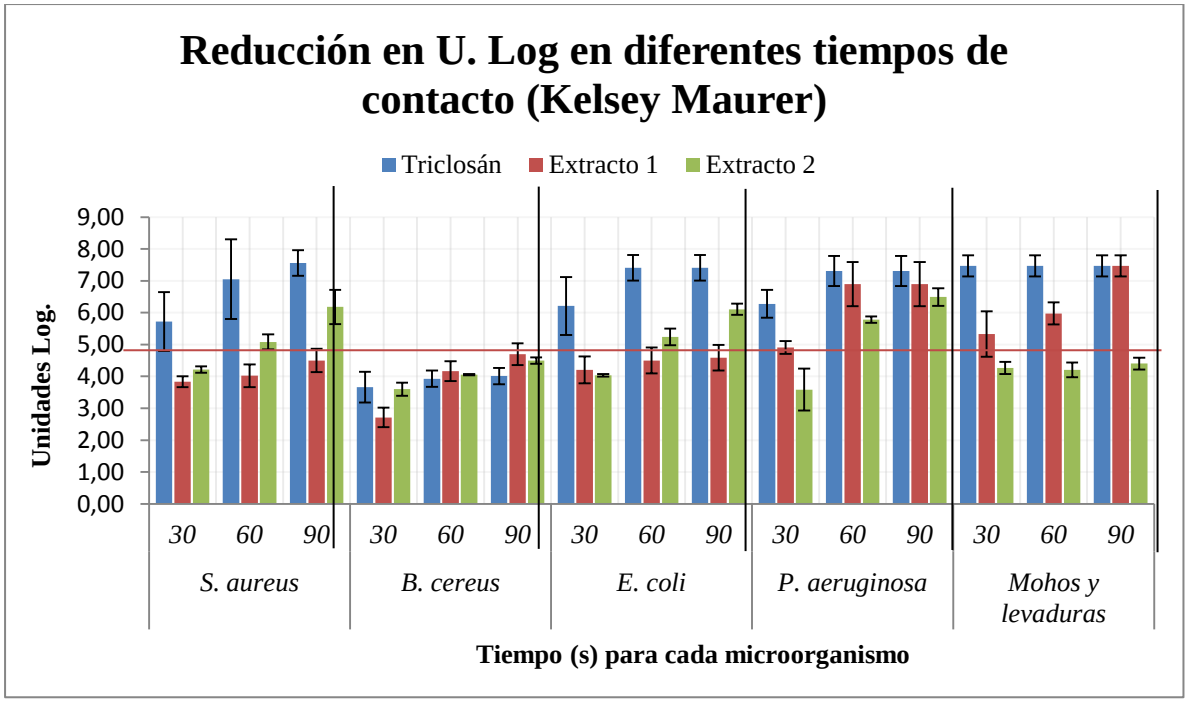


Figura 10. Determinación de la actividad bactericida de los activos antimicrobianos. Representadas en la reducción de unidades logarítmicas que presentó cada microorganismo.

El comportamiento de cada cepa fue diferente, para mohos y levaduras al cabo de los 30 sg en contacto con el triclosán, redujo 7,47 unidades logarítmicas, enseguida fue *E coli*, *P. aeruginosa* con reducción de más de 7 unidades logarítmicas en 60 y 90 sg y *S. aureus* a los 90 sg, con lo cual se comprueba que el activo es capaz de actuar desde que entra en contacto con el microorganismo, como activo puro en tiempo real.

Con respecto a los extractos 1, al cabo de los 90 sg alcanzó una reducción igual que el triclosán contra mohos y levaduras, siendo estos dos activos efectivos en la acción biocida. Figura 10.

En cuanto al comportamiento de la efectividad del extracto 1 y 2, el extracto 1 fue más efectivo, ya que redujo más de 6 unidades logarítmicas al cabo de los 90 sg de contacto para *P.aeruginosa*, mohos y levaduras, siendo el más efectivo contra *B.cereus* que redujo .4,70 unidades logarítmicas ya que fue el microorganismo más resistente hacia los activos, mientras que el extracto 2, alcanzó la reducción en un menor tiempo para *S.aureus* y *E.coli* con reducción en 6 unidades logarítmicas al cabo de los 90 sg de contacto, pero obtuvo reducciones menores al criterio mínimo de aceptación establecido que era reducir 5 unidades logarítmicas, utilizado como activo puro en el tiempo real.

Para *B. cereus* en particular, tiene la capacidad de formar esporas como estructuras de resistencia, por ende fue el microorganismos que presento menor reducción logarítmica frente a los activos antimicrobianos. La resistencia de *B.cereus*, a los desinfectantes se atribuye a que los microorganismos esporulados forman una barrera a la entrada de los agentes biocidas, ya que las membranas que rodean el núcleo de la endospora actúa como factor adicional al limitar la penetración del agente antimicrobiano (Henao, Sierra, & Galán, 2017).

Cuando se evalúa un antimicrobiano frente a un microorganismo esporulados como *B.cereus*, es preciso aumentar el tiempo de exposición por ciertas razones; las esporas poseen un núcleo con un gran contenido en dipicolinato de calcio, además el núcleo se encuentra parcialmente deshidratado, esta característica aumenta la termoresistencia de la espora y al mismo tiempo le confiere resistencia frente a sustancias químicas como el peróxido de hidrógeno. Además, del bajo contenido en agua de la espora, el pH del citoplasma del núcleo contiene niveles elevados de proteínas específicas del núcleo denominadas pequeñas proteínas ácido-solubles de la espora (SASPs). Estas proteínas se unen estrechamente al ADN en el núcleo de la espora y la protegen de daños potenciales por la radiación UV, la desecación y agentes biocidas (Nicholson, Munakata, & Horneck, 2000).

Los resultados obtenidos en esta prueba, para cada microorganismos demuestran que la efectividad de los activos puros, está influenciado directamente por el tiempo de exposición, donde la concentración de los activos es capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos los cuales fueron: 0.3% para el triclosán y 0.5 % para extracto 1 y 2, ya que con este valor de contacto, se alcanzaron resultados muy satisfactorios. De acuerdo con las proporciones que se establecen en los ensayos microbiológicos, para la evaluación de las tres concentraciones de los activos según la técnica utilizada, en este estudio (Kelsey Maurer), se obtuvo resultados totalmente satisfactorios, puesto que al enfrentar las cepas microbianas al triclosán, a una concentración menor que los extractos, se comprobó que la misma ejerce una total de inhibición del crecimiento microbiano en un tiempo de exposición de 90 sg, propuesto según el tiempo que transcurre al actuar un jabón antibacterial.

4.2.2 Técnica de susceptibilidad por disco en agar (Kirby-Bauer)

En esta técnica, la capacidad antimicrobiana es medida a través del diámetro del halo de inhibición, el cual es afectado por dos factores: El microorganismo y el activo, en donde la actividad antimicrobiana de los extractos y el triclosán es evaluada sobre los diferentes microorganismos seleccionados. A continuación se presentan la tabla (tabla 6) que describen los resultados de la técnica. En todos los casos, los puntos representan los diámetros de los halos de inhibición que se obtuvieron en el experimento para cada extracto y triclosán.

Cuadro 6. Tamaño halos de inhibición (mm), promedio, de los extractos 1, 2 y triclosán.

		MICROORGANISMOS EVALUADOS					
		S. aureus	*E coli*	*P. aeruginosa*	*B. cereus*	*A.niger*	*Candida sp*
PRODUCTO	CONCENTRACIÓN	Tamaño del halo (mm)					
TRICLOSÁN	0,005	24	20	0	6	0	1
	0,100	25	21	0	6	0	2
	0,125	26	21	0	7	0	2
	0,150	26	22	0	7	0	2
	0,175	26	22	0	8	1	4
	0,200	27	23	0	8	1	4
	0,225	27	23	0	9	1	4
	0,250	29	25	1	10	2	4
	0,275	30	26	2	11	3	4
	0,300	30	26	4	12	4	5
EXTRACTO 1	0,005	1,7	0,7	0,0	1,0	0,0	0,0
	0,1	2,0	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0
	0,15	2,0	1,0	0,7	1,7	0,0	0,0
	0,2	2,0	1,7	1,0	2,0	1,0	0,0
	0,25	3,0	2,0	1,7	2,0	2,7	0,0
	0,3	3,0	2,0	1,7	2,0	3,0	0,0
	0,35	3,7	2,0	2,7	2,7	3,0	0,0
	0,4	4,0	3,0	2,7	3,0	3,7	1,0
	0,45	4,0	3,0	3,0	3,0	5,7	2,0
	0,5	5,0	3,7	4,0	3,0	6,7	4,0
EXTRACTO 2	0,005	1,0	1,7	1,0	0,0	0,0	0,0
	0,1	1,0	2,0	1,0	0,0	0,0	0,0
	0,15	1,0	2,0	1,7	1,0	0,0	0,0
	0,2	1,0	2,7	2,0	1,0	1,0	0,0
	0,25	2,0	3,0	2,7	1,0	2,7	0,0
	0,3	2,0	3,0	2,7	2,0	3,0	0,0
	0,35	2,0	3,0	3,7	2,0	3,0	0,0
	0,4	2,7	3,7	3,7	2,0	3,7	1,0
	0,45	3,0	4,0	4,0	3,0	5,7	2,0
	0,5	3,0	4,0	5,0	3,0	6,7	4,0

Fuente: elaboración propia

Se observa claramente que el diámetro de los halos de inhibición de los extractos 1 y 2 para *S. aureus* fueron menores que el triclosán, desde la concentración de partida hubo sensibilidad de 24 mm, alcanzando medidas en 0.3% de concentración máxima halos de 30 mm, siendo mayores a 20 mm lo cual se interpreta como sensible al microorganismo, el poder inhibidor de los extracto cítricos presentaron baja actividad, el extracto 1 solo se alcanzó un halo de 5 mm, con respecto al extracto 2, que alcanzó una concentración de 0.5% halos de 3 mm, lo que se interpreta como resistente ya que fueron menores a 14 ms.

Las posibles razones para que el crecimiento del microorganismo se viera poco afectado por los extractos cítricos es la existencia de mecanismos de resistencia por parte de *S. aureus*, la cual está relacionada con la activación de una síntesis de la pared celular, con hiperproducción de proteínas ligadoras de penicilinas, engrosamiento de la pared y el encarcelamiento de fármacos por hiperproducción de los componentes de pared.

Estudios previos han demostrado que *S. aureus* posee genes que le permiten generar resistencia contra biocidas (Agentes químicos y antibióticos) (Tavares, 2000).

En el caso de *E.coli*, el extracto 2 evidencio medidas de 4 mm al 0.5%, siendo estos muy cercanos en comparación al extracto 1, que alcanzó al 0.5% halos de 3.7 mm, se interpreta como resistentes por reportar medidas menores a 14 mm, con respecto al triclosán, el diámetro de los halos de inhibición fue mayor, partiendo desde 20 mm hasta 26 mm en su máxima concentración de 0.3%, interpretándose como sensible al microorganismo, por tener medidas superiores a 20 mm.

E. coli hace parte de las bacterias Gram negativas, además del peptidoglicano, poseen una capa adicional en su pared que está compuesta de lipopolisacáridos. Esta capa representa una segunda bicapa lipídica, que no consta solamente de fosfolípidos como la membrana plasmática, sino que contiene polisacáridos y proteínas. Los lípidos y polisacáridos están estrechamente unidos en la capa externa formando estructuras lipopolisacáridas específicas. La presencia del lipopolisacárido justifica que la membrana externa se denomine generalmente capa de lipopolisacárido o simplemente LPS.

Los mecanismos de resistencia de estas bacterias pueden presentarse como alteración del sitio blanco o diana de antimicrobianos, disminución de la permeabilidad de la pared por poseer una pequeña capa de peptidoglicano, la cual es más sensible, adquisición de mecanismo de cambio de vía metabólica externa, lo anterior podría sugerir que el extracto 2, puede poseer sustancias capaces de contrarrestar los mecanismos de resistencia del microorganismo, como por ejemplo las saponinas las cuales actúan sobre los lípidos de la membrana ocasionando alteraciones y provocando muerte celular; así como lo indica la Tabla 4.

Por otra parte, *P. aeruginosa* permitió evidenciar que su efecto bactericida anteriormente demostrado con el triclosán se vio afectado, en los primeras volúmenes utilizados, ya que no hubo halos de inhibición, permitiendo a los extractos cítricos inhibir el crecimiento desde un volumen mínimo de 0.005%, sin embargo se interpretaron como resistentes ya que sus halos no superaron los 5 mm.

La resistencia de *P. aeruginosa* es atribuida a varios factores que han sido consignados en diversos estudios. (Russell & Furr, 1998), estableció que las bacterias Gram negativas poseen reducida sensibilidad hacia los desinfectantes comparados con los estafilococos debidos a los lipopolisacáridos de su membrana externa que impiden el flujo de los desinfectantes al interior de la célula. Por otra parte Gorisch (2003) estableció que *P. aeruginosa* es capaz de crecer en etanol e inducir enzimas capaces de oxidarlo y metabolizarlo a acetato.

Se observa para *B.cereus* que el efecto inhibidor del triclosán es mayor, sus halos de inhibición al 0.3% fue de 12 mm donde se interpreta como resistente, al compararlo con los extractos 1 y 2 obtuvieron halos de 3 mm al 0.5%, siendo uno de los microorganismos más resistentes a la prueba, inhibir un bacilo Gram positivo esporulados, que posee como factor de competencia y resistencia regulada, expresa proteínas especiales que juegan un papel en el transporte y procesamiento del DNA. Estas proteínas específicas de competencia incluyen una proteína de unión del DNA que está asociada a la membrana, una autolisina de la pared celular y varias nucleasas (Gutowski, 1997).

En la tabla 10, se puede apreciar que para la levadura *Cándida sp* y el hongo *A.niger* ninguno de los extractos vegetales, triclosán logró generar halos con diámetro superior a 14 mm. Lo que indica que los extractos cítricos no presentaron una eficiente actividad antimicrobiana frente a este tipo de microorganismos, por ser complejos y adicionalmente poseer diversos mecanismos de resistencia entre las que encontramos la pared celular compuesta de polisacáridos, proteínas, lípidos, iones inorgánicos y mananos. Los polisacáridos (Quitina) y glucanos no celulósicos. Los resultados anteriormente expuestos sugieren que los extractos evaluados son más eficientes con bacterias debido a que sus estructuras y el metabolismo celular son menos complejo que el de los hongos (Tavares, 2000).

4.2. Valoración de la efectividad de los productos mediante la valoración de las condiciones higiénicas de las manos del personal de diferentes áreas de la compañía.

El lavado de manos se llevó a cabo con los jabones que contenían los ingredientes activos antimicrobianos que estuvo en estabilidad durante los 3 meses bajo estudio (ver Anexo 14). A partir de la recolección de muestras de la superficie de la mano antes y después del lavado higiénico en las 3 áreas, se evaluó la técnica de cuantificación por inoculación directa así como por diluciones, para así tener un conteo más preciso, en ninguna de las áreas bajo estudio no se evidencio crecimiento para *P. aeruginosa* en las manos de los participantes, en la figura 11, se muestra los intervalos de confianza para la media y mohos y levaduras.

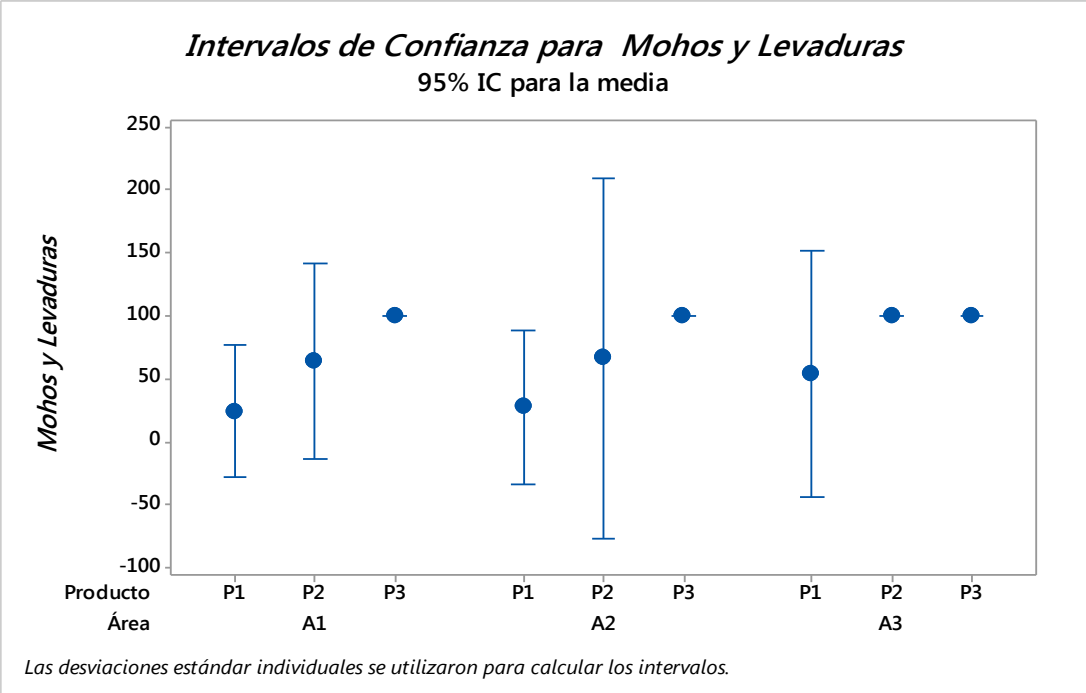


Figura 11.Intervalos de confianza para mohos y levaduras, de acuerdo al área y efectividad del producto.
Convenciones: P1: Extracto 1; P2: Extracto 2; P3: Triclosán.
A1: Área Administrativa; A2: Área Laboratorios; A3: Área Producción.
Fuente: elaboración propia

La efectividad de los jabones con los activos antimicrobianos, Extracto 1, 2 y triclosán frente a Mohos y Levaduras en las manos del personal de la compañía, se observa que para las 3 áreas, la eliminación es igual en promedio, pero para el área 1 los resultados fueron más homogéneos o menos variables. Si analizamos los resultados obtenidos por cada jabón, podemos objetivar, que al utilizar el jabón con el triclosán, tras el lavado de manos la efectividad con respecto a la reducción en unidades logarítmicas fue del 100 %, seguido del jabón con el extracto 2 y jabon con extracto 1 con 95% de confianza.

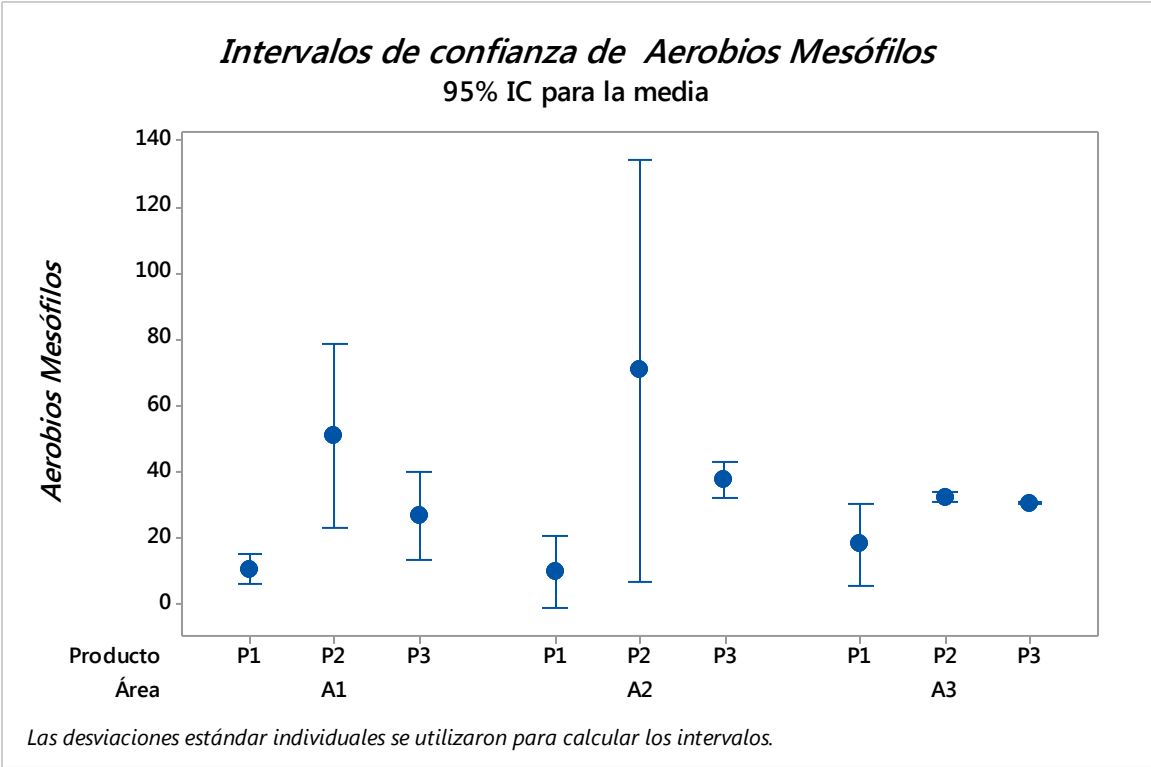


Figura 12.Intervalos de confianza para Aerobios mesófilos, de acuerdo al área y efectividad del producto.
Convenciones: P1: Extracto 1; P2: Extracto 2; P3: Triclosán
A1: Área Administrativa; A2: Área Laboratorios; A3: Área Producción
Fuente: elaboración propia

Analizando los resultados obtenidos tras le lavados de manos con el jabon que tiene el activo con el extracto 2 en el área 2, la efectividad en Aerobios Mesófilos, como se observa en la figura 12, tuvo mayor eliminación en promedio, pero a su vez fue la que tuvo mayor variabilidad o resultados diferentes, a diferencia de todos los productos (P1, P2, P3) que presentaron resultados muy homogéneos en las 3 áreas.

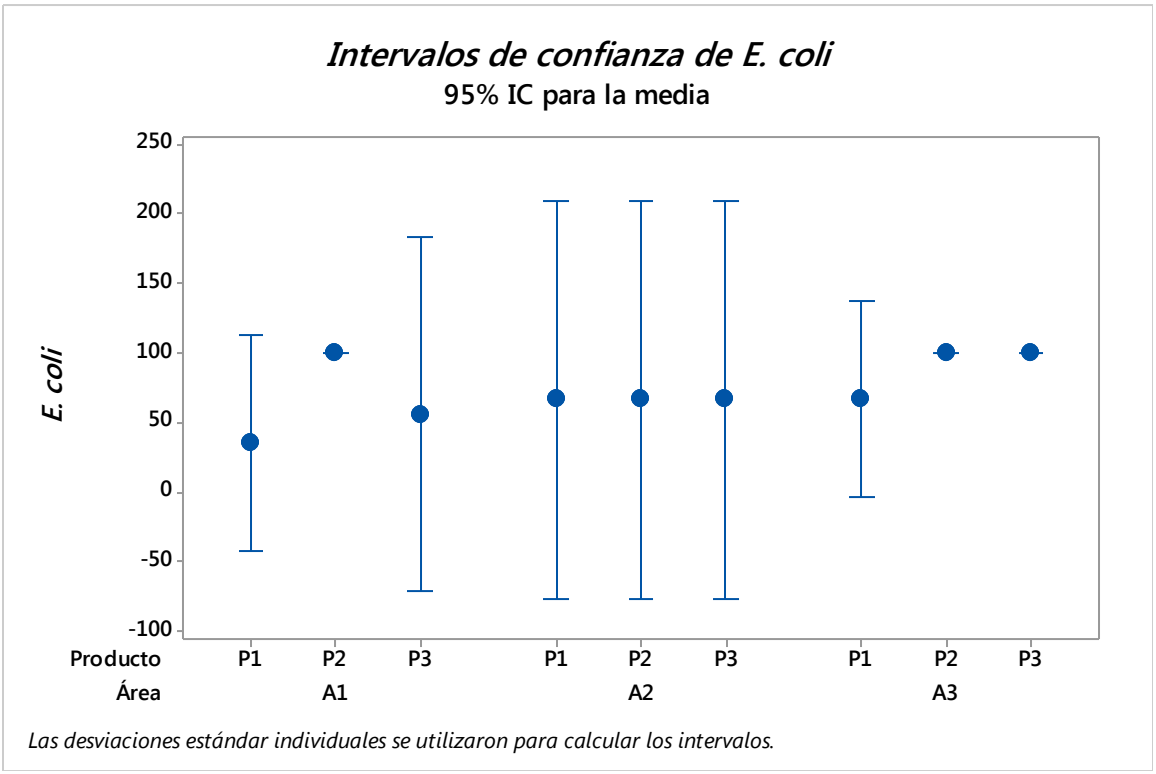


Figura 13. Intervalos de confianza para *E.coli*, de acuerdo al área y efectividad del producto.
Convenciones: P1: Extracto 1; P2: Extracto 2; P3: Triclosán; A1: Área Administrativa; A2: Área Laboratorios; A3: Área Producción
Fuente: elaboración propia

Analizando los resultados obtenidos por cada jabon en las 3 áreas, se puede objetivar que la efectividad de *E. coli*, se presentó en promedio una disminución homogénea, observándose que el Extracto 2, fue más eficiente en relación a los demás productos ya que obtuvo para el área 1 y 3 100% en su efectividad en comparación a los otros dos jabónes., *Figura 13*, siendo el área 1, el más variable de acuerdo a los resultados.

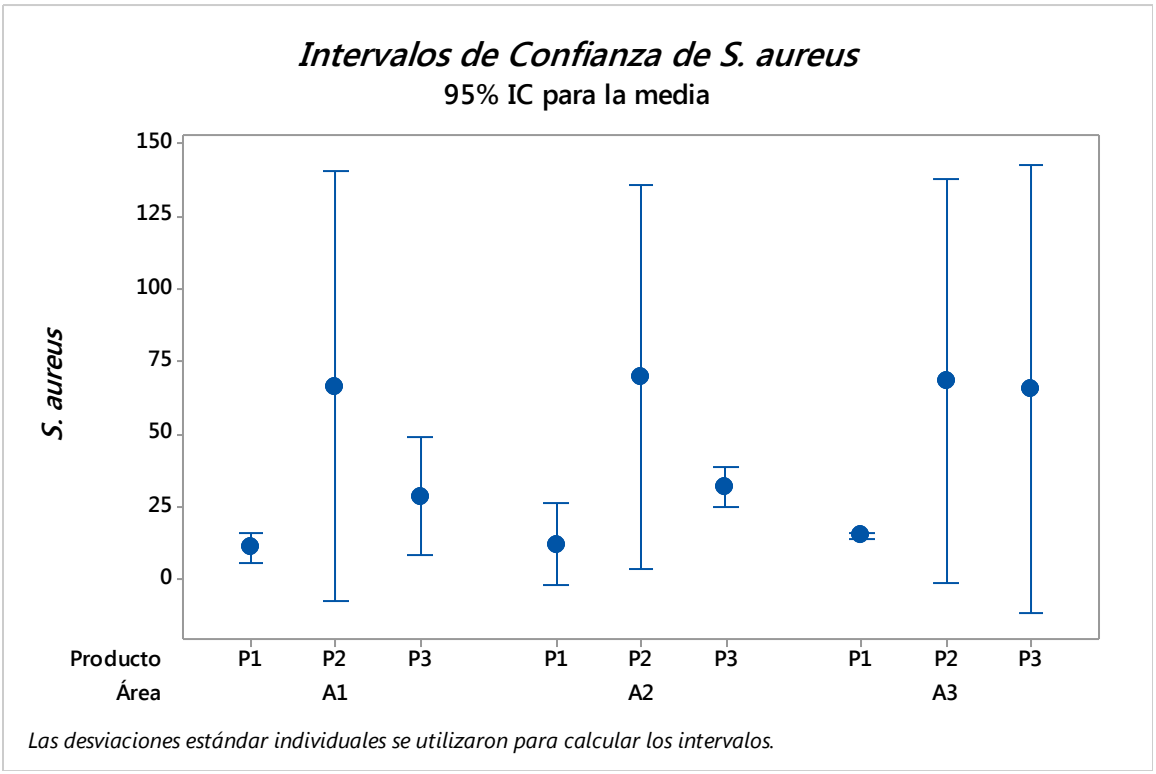


Figura 14. Intervalos de confianza para *S.aureus*, de acuerdo al área y efectividad del producto. Convenciones: P1: Extracto 1; P2: Extracto 2; P3: Triclosán; A1: Área Administrativa; A2: Área Laboratorios; A3: Área Producción
Fuente: elaboración propia

Con respecto a la efectividad de los productos sobre *S. aureus*, *Figura 14*, se observa que en las 3 áreas el Extracto 2, presentó la mayor eficiencia con 95% de confianza, pero también, tuvo la mayor variación en los resultados, por otro lado, el Extracto 1 fue el menos eficiente y la menos variable en las 3 áreas.

En relación a los resultados obtenidos con cada jabòn, se puede deducir que al emplearlo para el lavado de manos, en el personal de las 3 áreas, el extracto 2, realiza una disminución en los valores de la carga bacteriana en su efecto inmediato, tanto para aeróbios mesófilos, *E. coli. S. aureus* y siendo menos eficiente para mohos y levaduras.

En relación a los resultados obtenidos por el extracto 1, en su efecto inmediato, observamos que la reducción en los valores de la carga bacteriana con respecto a *E. coli*, fueron los que tuvieron más significancia con valores de 66% de reducción para el área 2 y 83% de reducción para el área 3, fue donde tuvo efectividad ya que con respecto a mohos y levaduras, aérobios mesófilos y *S.aureus* no supero el 34% de efectividad en el lavado de las manos.

Examinando los resultados obtenidos por el triclosán, como ya se había dicho, únicamente fuè efectivo para mohos y levaduras, con respecto a aérobios mesófilos, no supero su efectividad de 37% en reducción de unidades logarítmicas para las 3 àreas, en cuanto *a E.coli* fue el segundo

mas efectivo siendo el mejor el extracto 2 ya que obtuvo efectividad en el área 2 y 3 con 66% y 100% respectivamente, para *S. aureus*, el triclosán, la efectividad no superò el 65%, para èste microorganismoa ha sido uno de los más estudiados en relación al triclosàn y resistencia a los antibióticos, donde Suller y Rusell (2000), han afirmado que las cepas con mayor susceptibilidad a los biocidas también pueden ser mas susceptibles a los antibióticos. Probamos la susceptibilidad de aislados clínicos de *S. aureus* a triclosán y varios antibióticos. Las CIMs de triclosán variaron entre 0.025 y 1 mg / L. Algunas cepas, pero no todas, fueron resistentes a varios antibióticos y mostraron alta resistencia al triclosán.

4.3.1. Interacciones de la eficacia promedio de los jabones antimicrobianos frente a la carga microbiana tomada en cada una de las áreas bajo estudio.

Teniendo en cuenta los resultados de la eliminación promedio, es necesario observar cuales fueron las interacciones de la efectividad promedio para los microorganismos, tal como se muestra a continuación:

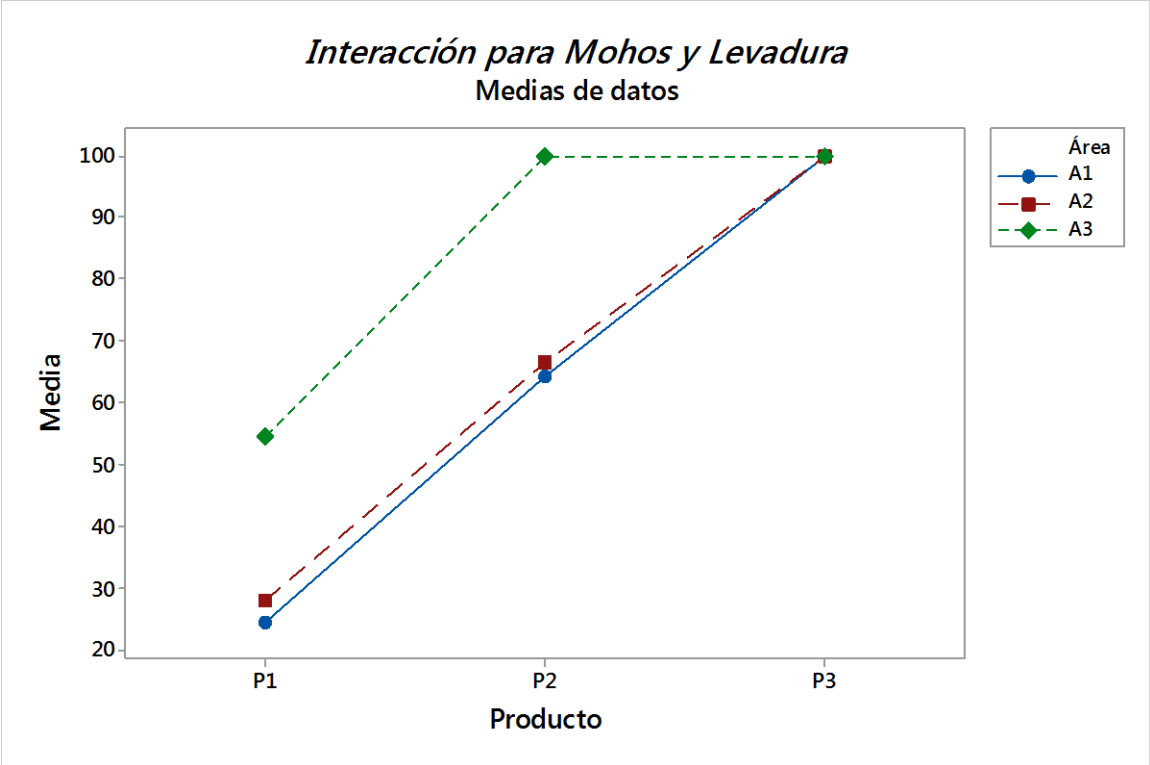


Figura 15. Interacciones de la media Mohos y Levaduras entre jabónes antimicrobianos y Área. Convenciones: P1: Extracto 1; P2: Extracto 2; P3: Triclosán; A1: Área Administrativa; A2: Área Laboratorios; A3: Área Producción
Fuente: elaboración propia

Para Mohos y Levaduras, se observa en la anterior Figura 15, que en promedio la efectividad de los jabónes con respecto a las áreas, fue mayor en el área 3, con los Extractos 1 y 2, por otro lado el Triclosán fue el que tuvo mayor eliminación fingicida en las 3 áreas.

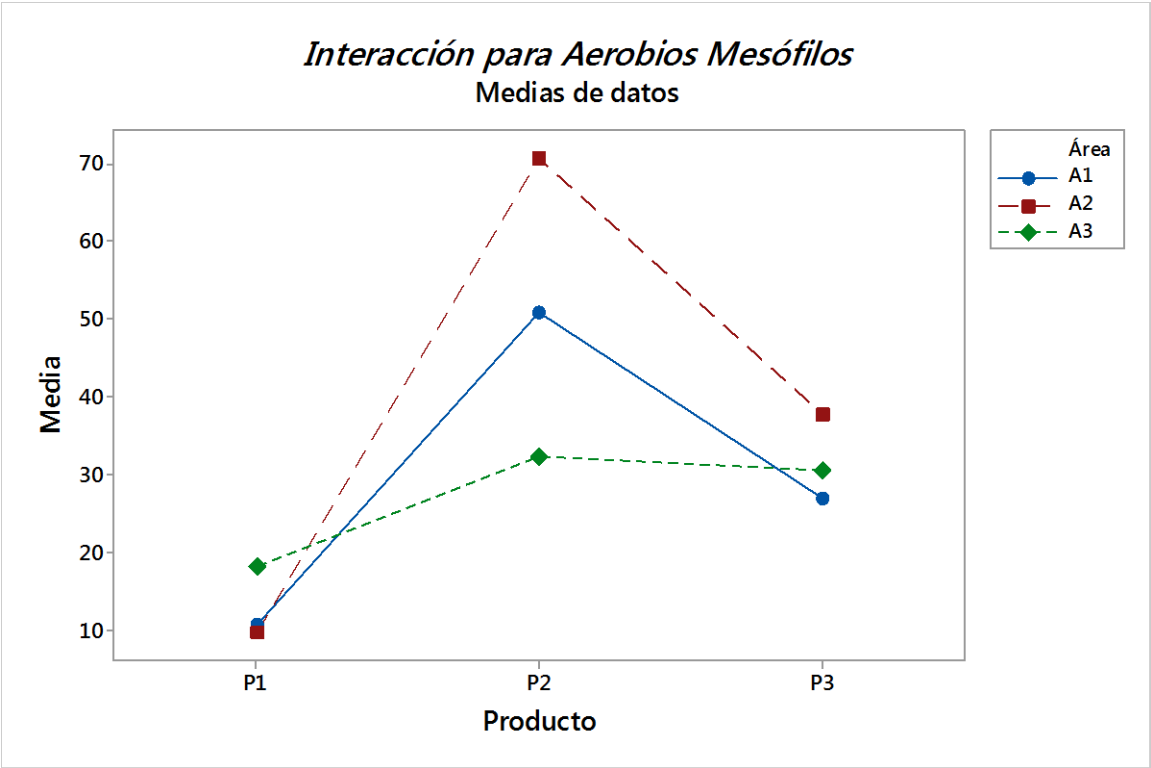


Figura 16. Interacciones de la media Aerobios Mesófilos entre jabónes antimicrobianos y Área. Convenciones: P1: Extracto 1; P2: Extracto 2; P3: Triclosán; A1: Área Administrativa; A2: Área Laboratorios; A3: Área Producción
Fuente: elaboración propia

De acuerdo a la interacción promedio la efectividad de Aerobios mesófilos, en la figura 16, se aprecia que la eliminación promedio fue mayor por el Extracto 2 en las tres áreas, y la menor eliminación promedio fue por el Extracto 1 en las 3 áreas.

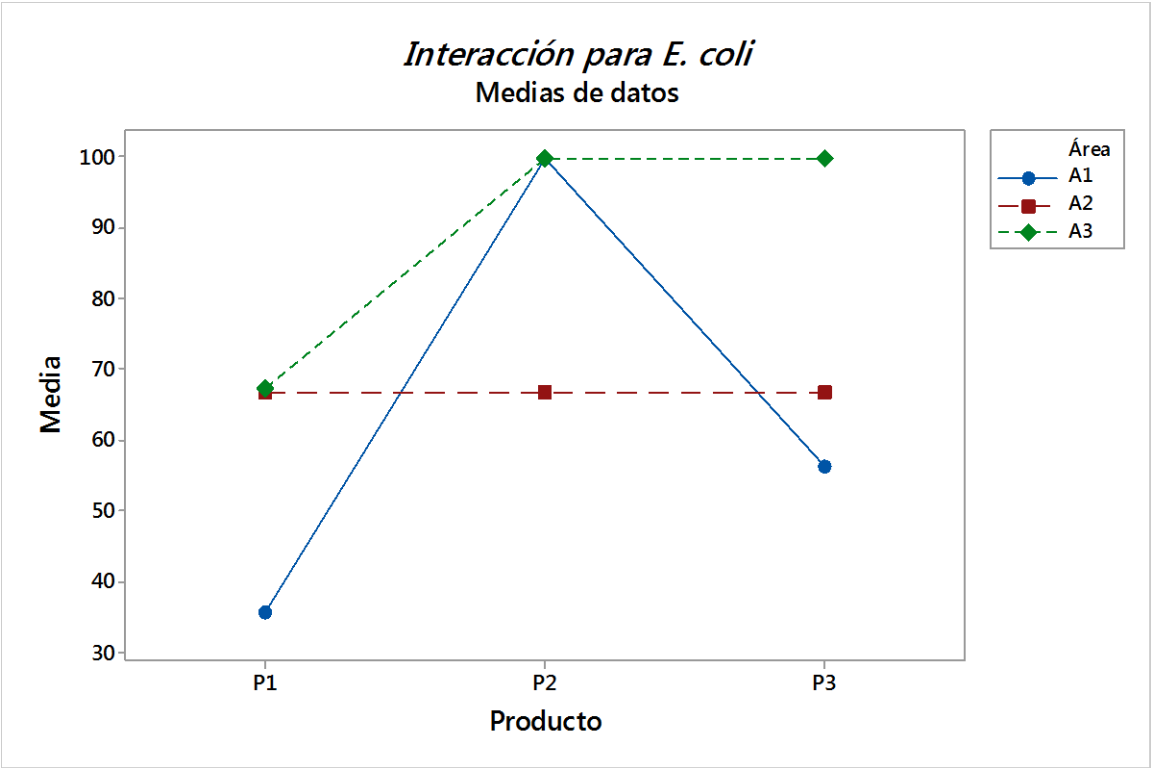


Figura 17. Interacciones de la media *E.coli* entre jabónes antimicrobianos y Área.
Convenciones: P1: Extracto 1; P2: Extracto 2; P3: Triclosán; A1: Área Administrativa; A2: Área Laboratorios; A3: Área Producción
Fuente: elaboración propia

La interacción promedio de *E.coli*, como se aprecia en la figura 17, se observa que el Extracto 2 fue estadísticamente significativo ya que fue más eficiente en el área uno y tres, con respecto al extracto 1, la disminución en los valores de la carga bacteriana en su efecto inmediato no son estadísticamente significativos que en relación al triclosán que obtuvo actividad reducción en el área 3.

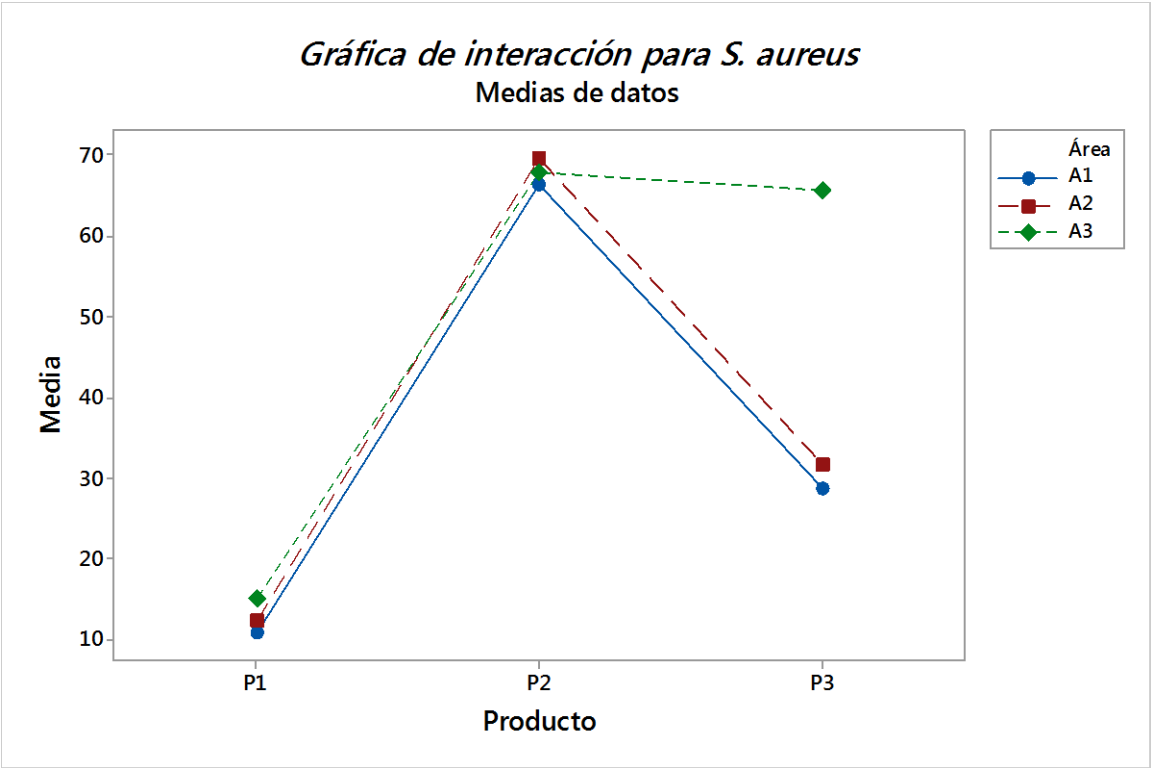


Figura 18. Interacciones de la media *S. aureus* entre jabones antimmicrobianos y Área.
Convenciones: P1: Extracto 1; P2: Extracto 2; P3: Triclosán; A1: Área Administrativa; A2: Área Laboratorios; A3: Área Producción.
Fuente: elaboración propia

La interacción promedio de *S. aureus*, queda reflejado en la figura 18, los valores obtenidos en el efecto inmediato de la actividad antibacterial de los jabones, siendo el Extracto 2, estadísticamente significativo en relación a las tres áreas, comparando los resultados obtenidos por el extracto 1 y el triclosàn, en su efecto inmediato, observamos que no existen diferencias estadísticamente significativas en las áreas de la compañía.

4.4. Promedio de la acción de los jabone sobre los microorganismos evaluados

Para observar la efectividad de los productos con respecto a los microorganismos, como se muestra en la Figura 19, el Extracto 2, presentó mayor eliminación en todos los microorganismos evaluados, a excepción de Mohos y Levaduras, que fue más eficiente el Triclosán, por otro lado el Extracto 1, fue el que tuvo menor efectividad promedio de todos los microorganismos, es necesario aclarar que estos resultados son evidenciados sin tener en cuenta el área done se realizó el experimento.

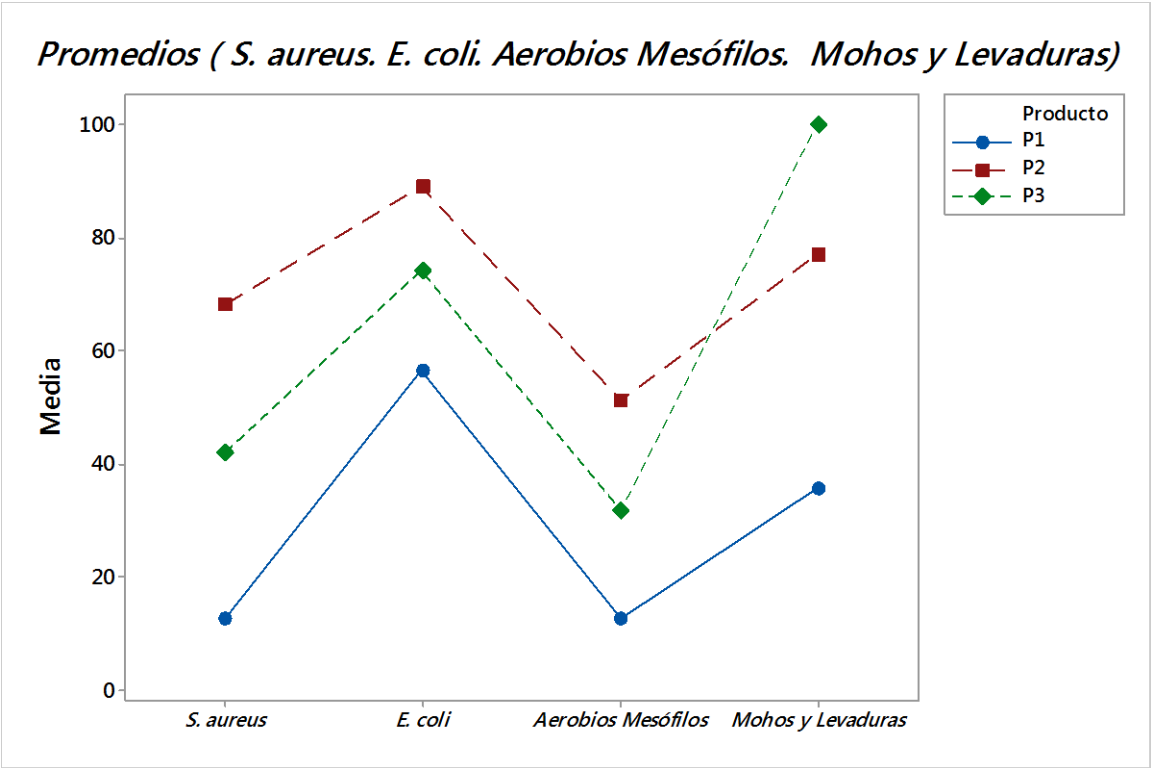


Figura 19. Medias de los microorganismos por Activo Antimicrobiano.
Convenciones: P1: Extracto 1; P2: Extracto 2; P3: Triclosán
Fuente: elaboración propia

De acuerdo a lo expuesto anteriormente se evidencia que, el Extracto 2 en sus ingredientes activos: Terpenos cítricos y ácidos orgánicos, es más eficiente que el Extracto 1 y Triclosán, como jabón antibacterial en el lavado de manos del personal de la compañía, estudios realizado por revelaron que los mecanismos involucrados en la inhibición de los microorganismos por los aceites esenciales, terpenos, extractos cítricos, parecen ser múltiples. Se plantea que en el efecto inhibitorio se involucran compuestos fenólicos; pues estos sensibilizan la bicapa fosfolípidica de la membrana citoplasmática, causando un incremento en la permeabilidad y la no disponibilidad de constituyentes intracelulares vitales, demostrando que el efecto antimicrobiano de los constituyentes de los extracto naturales depende de su hidrofobicidad y partición en la membrana plasmática microbiana, entre otros. Esto está estrechamente relacionado con la adición de iones específicos en o sobre la membrana, que tiene un efecto marcado, sobre el movimiento de los protones, el contenido de ATP intracelular y toda la actividad de la célula microbiana, incluyendo el transporte de soluto y la regulación del metabolismo (Mohamed, 2011).

5. CONCLUSIONES

La estabilidad de los activos en los jabones antibacteriales, frente el extracto 2, permanece su actividad antimicrobiana durante los días transcurridos en un rango no superior a 107980 ppm, el triclosán fue relevante contra mohos, ya que en relación con la CMI, no superó los 107980 ppm de concentración, en cambio el extracto 2, su funcionalidad necesitó 226757 ppm y 118777 ppm para el extracto 1.

Se comparó la acción bactericida de los extractos y Triclosán como activos puros arrojándonos que mediante la técnica de Kelsey Maurer la acción de los activos puros, está influenciado directamente por el tiempo de exposición, donde la concentración de los activos es capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos, el Extracto 1 y 2 reduce significativamente el número de unidades formadoras de colonias (UFC), de bacterias y hongos, permitiendo establecer los 90 segundos de contacto como tiempo óptimo para los extractos, frente al triclosan que redujo 7,47 unidades logarítmicas al cabo de los 30 sg.

Con la técnica Kirby-Bauer, los activos no se evidenciaron medidas superiores a 6.7 mm en los halos de inhibición para los Extracto 1 y 2, en cambio el Triclosán los halos tuvieron medidas mayores a 20 mm.

Existen diferencias significativas, cuando se compara el efecto del extracto 1 y el triclosán frente al extracto 2 teniendo dicho jabòn antibacterial con mayor eficacia microbicida en su efecto inmediato sobre las manos con porcentajes de eficiencia del 66 y 100%.

Se evidenció que productos naturales a base de terpenos y ácidos orgánicos, usados como activos en jabones para manos, pueden ser una alternativa de reemplazo del triclosán en jabones antibacteriales, también en la búsqueda bibliográfica no se encontraron estudios relacionados, motivando a posteriores estudios, utilizando extractos naturales para substituir compuestos químicos de alto riesgo para la salud humana.

6. RECOMENDACIONES

Ajustar espectrofotométricamente la densidad de las suspensiones bacterianas a 620 nm de longitud de onda, para obtener una absorbancia de 0.2 a 0.3 para bacilos Gramnegativos y de 0.3 a 0.4 para cocos Gram positivos, lo cual puede ser útil al momento de preparar una suspensión con un recuento comprendido entre 1 y 3x108 UFC/ml. La cual no se realizó por falta de equipos.

Realizar la evaluación de los extractos cítricos frente a otros géneros, y ambientes como clínicos y sector de alimentos, la cual según la búsqueda bibliográfica también tienen aplicaciones.

Evaluar la sinergia entre los activos que ayuden a mejorar su efectividad frente a los grupos microbianos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Hospital tunal. (24 de Agosto de 2017). Obtenido de www.hospitaleltunal.gov.co/educacion/lavado_de_manos.htm

Abraham, S. (2001). Anti-genotoxicity of trans-anethole and eugenol in mice. *Food Chem*, 493-498.

Allmyr, M., Adolfsson-Erici, M., & McLachlan, M. (2006). Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. *Sci Total Environ*, 87-93.

Aly, R., & Maibach. (1979). Comparative study on the antimicrobial effect of 0.5% chlorhexidine gluconate and 70% isopropyl alcohol on the normal flora of hands. *Appl Environ Microbiol*, 354-400.

Bagamboula, C., & Uyttendaele, M. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards Shigella sonnei and S. flexneri. *Food Microbiol*, 33-34.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2005). Phenolic compounds in plants and agroindustrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*, 191-203.

Balmer, M., Buser, H., Müller, M., & Poiger, T. (2005). Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss Lakes. *Environ Sci Technol*, 953.

Botelho, M. (2003). Antimicrobial activity essential oil 13. from Lippia sidoides, carvacrol and thymol against oral pathogens. *J Med Biol* , 349-56.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Food Microbiol*, 223-253.

Burton, W., & Wilcke, J. (2001). Compendium of Methods Microbiological Examination of Foods. *Frances Pouch Downes Keith Ito*.

Cabrera, C., & Gomez, R. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes. *Colombia medica*, 3-9.

Cáceres, A. (1996). *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala.* Guatemala: Editorial Universitario.

Calafat, A., Ye, X., Wong, L., Reidy, J., & Needham, L. (2008). Urinary Concentrations of Triclosan in the U.S. Population: 2003–2004. *Environmental Health Perspectives*, 303-307.

Carnesecchi, S., & Schneider, J. (2001). Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *Pharmacol*, 197-200.

Carrillo, I. (1999). Efecto de la actividad de agua, pH y temperatura de incubación en la capacidad antimicótica de mezclas de benzoato de sodio-vainilla.

Chaibi, A., Ababouch, K., Belasry, S., & Busta, F. (1997). Inhibition of germination and vegetative growth of Bacillus cereus T and Clostridium Botulinum 62A spores by essential oils. *Food Microbiol*, 161-174.

Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol*.

Cunha, D., & Matos, F. (25 de Agosto de 2017). *National Center for Biotechnology Information*. Obtenido de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22241204

Daferera, D., & Ziogas, N. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of Botrytis cinerea, Fusarium sp. and Clavibacte michiganensis subsp. Michiganensis. *Crop Prot*, 39-44.

Dorman, H., & Deans, G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibectial activity of plant volatile oils. *Microbiol*, 308-316.

EPA. (2008). En vironmental Protección Agency- Office of Prevention, Pesticides And Toxic Substances. United States.

Espigares, E., Bueno, A., Fernández, M., & Espigares, M. (2003). Efficacy of some neutralizers in suspension tests determining the activity of disinfectants. *Journal of Hospital Infection*, 137-140.

European Federation of Essential Oils. (3 de Octubre de 2017). *E.F.E.O*. Obtenido de http://www.efeo-org.org

Evans, & Smith, W. (1950). Bacterial flora of the normal human skin. *J Invest Dermatol*, 24.

Evans, J., & Martin, S. (2000). Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Curr Microbiol*, 336-340.

FDA. (2010). Supporting Information for Toxicological Evaluation by the National Toxicology Program. *Food & Drug Administration*.

FDA. (03 de 10 de 2017). *U.S Departament of Health & Human Services*. Obtenido de https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnnavigation.cfm?rpt=eafuslisting

Fitzpatricks , T., Risen , A., & Freedberg I , I. (1999). *Dermatology in general medicine.* EUA: McGraw-Hill.

Gomez, J., Lopez, A., Lopez, M., Gomez, M., & Montero, P. (2010). Gomez-Estaca J., Lopez de Lacery A., Lopez-Caballero M.E., Gomez- Guillen M.C., Montero P. (2010) Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oil as antimicrobial agents for fish preservation. Food Microbiology. 27 (889-896). *Food Microbiology*, 889-896.

Gorisch, H. (2003). The ethanol oxidation system and its regulation in Pseudomonas aeruginosa. *Biochimica et Biophysica*, 98-102.

Gupta, V., Kohli, K., Ghaiye, P., Bansal, P., & Lather, A. (2011). Pharmacological potentials of Citrus Paradisi - An overview. *Int J of Phytother Res*, 8-17.

Gutowski, E. (1997). Evidence for a multimeric subtilin synthetase complex. *J Bacteriol*, 1475–1481.

Helander, I., & Alakomi, K. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Agric. Food Chem*, 3590-3595.

Henao, S., Sierra, C., & Galán, A. (22 de Octubre de 2017). *Actividad bactericida del acido hipocloroso. Investigacion original.* Obtenido de www.revmed.unal.edu.co/revistatm/v5n3/v51n3a2.html

Inouye, S., Takizawa, T., & Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their mayor constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contac. *Antimicrob*, 565-573.

Jones, R., Jampani, H., & Newman, J. (2000). Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *Am J Infect Control*, 96.

Karaman, S., Digrak, M., Ravid, U., & Ilcim, A. (2001). Antibacterial and antifungal activity of the essencial oils of Thymus revolutus Celak from Turkey. *Ethnopharmacology*, 183-186.

Krumm, S. W. (2002). *Water temperature doesn't affect hand washing*. Recuperado el 29 de Noviembre de 2017, de www.ljworld.com/section/

Kuate, J., Foko, J., Ndindeng, S., Jazet-Dongmo, P., Foure, E., Damesse, F., y otros. (2006). Effect of essential oils from citrus varieties on in vitro growth and sporulation of Phaeoramularia angolensis causing citrus leaf and fruit spot disease. *European Journal of Plant Pathology* , 151–161.

Labarreque, A. (1829). *Instructions and observations regarding the use of the chlorides of soda and lime.* New Haven.

Lambert, R., Skandamis, N., Coote, P., & Nychas, E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Microbiol*, 453-462.

Lee, K., & Shibamoto, T. (2001). Inhibition of malonaldehyde formation from blood plasma oxidation by aroma extracts and aroma components isolated from clove and eucalyptus. *Food Chem Toxicol*, 1199-204.

Lu, Y., Zhang, C., Bucheli, P., & Wei, D. (2006). Citrus Flavonoids in Fruit and Traditional Chinese Medicinal Food Ingredients in China. *Plant Foods for Human Nutrition*, 57 - 65.

Luby SP, A. M., Feikin, D., Painter, J., Billhimer, W., & Altaf, A. (2005). Effect of handwashing on child health: a randomised controlled trial. *Lancet*, 225-33.

Macías, W. (2014). *Proceso de obtención de extracto a partir de la semilla de la toronja (Citrus paradisi), y su aplicación en desinfección de vegetales o frutas y superficies planas.* Guayaquil.

Mantilla, L. (2017). *Efectividad del lavado de manos prequirúrgico en la reducción de la carga bacteriana, utilizando digluconato de clorhexidina y paraclorometaxilenol.* España.

Mohamed, A. (2011). Essential oils and Trichoderma harzianum as an integrated control measure against faba bean root rot pathogens. *J of Plant Protection Res*, 306-313.

Ngeow, Y., Ong, H., & Tan, P. (1989). Dispersal of bacteria by an electric air hand dryer. *Malays J Patho*, 53–6.

Nicholson, W., Munakata, N., & Horneck, G. (2000). Resistance of Bacillus endospores to extreme external terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology*, 64-548.

Okwu, D., Awurum, A., & Okorokkwo, J. (2007). Phytochemical composition and In Vitro antifungal activity screening of extracts from Citrus plants against Fusarium oxysporum of Okra plant (Hibiscus esculentus). *African Crop Science Conference Proceedings*, 1755-1758.

Orvos, D., & Versteeg, D. (2002). Aquatic toxicity of triclosan. *Environmental Chemistry*, 11.

Padrón, J., & Rocha, M. (2007). Variedades comerciales de cítricos para Nuevo León y Tamaulipas. Mexico.

Patrick, D., Findon, G., & Miller, T. (1997). Residual moisture determines the level of touchcontact-associated bacterial transfer following hand washing. *Epidemiol Infect*, 319–25.

Pelissari, F., Grossmann, M., Yamashita, F., & Pineda, E. (2009). Antimicrobial, Mechanical and Barrier Properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1372-1381.

Pérez, I., & Soto, N. (2003). *Estudio de factibilidad para la fabricación de jabón usando aceite de la semilla del fruto de la palma de la Coroba (Jessenia polycarpa karts).* Puerto de la cruz.

Ponce, A., Roura, C., & Moreira, M. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coating enriched with natural plants: in vitro and in vivo studies. *Postharvest Boil Technol*, 294-300.

Pouch, F. (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. *American Public Health Association*.

Rojas, M., Avena, J., Olsen, C., Friedman, M., & Henika, P. (2007). Effect of plant essential oils and oil compounds on mechanical barrier and microbial properties of alginate- apple puree edible films. *Food Engineering*, 634-641.

Rosenthal, & Ezcurra. (1999). Guia para el lavado de manos social, antisepsia y lavado quirurgico de las manos en areasde cuidado de salud. *Infectologia y Microbiologia clinica*, 10-12.

Roth, R., & James, W. (1989). Mycrobiology of the skin: resident flora, ecology infection. *American Academy of Dermatology*, 387-382.

Rotter, M. (1999). *Hand washing and hand disinfection.* Philadelphia: Mayhall CG.

Rule, K., Ebbett, V., & Vikesland, P. (2005). Formation of chloroform and chlorinated organics by free-chlorine-mediated oxidation of triclosan. *Environ Sci Technol*, 3176.

Russell, A. (2000). Triclosan y resistencia a antibióticos en Staphylococcus aureus. *J Antimicrob Chemother*, 11-8.

Russell, A., & Furr, J. (1998). Microbial susceptibility and resistance to biocides. *ASM News*, 481–487.

SCCS. (2010). Opinion on triclosan: Antimicrobial Resistance. *Scientific Committee on Consumer Safety*, 56.

Semmelweis, I. (1983). Etiology, concept, and prophylaxis of childbed fever. Madison WI: The University of Wisconsin Press.

Seyed, M., Masoud, R., & Seyed, H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 161-166.

Sharma, N., & Garg, V. (2011). Antihyperglycemic and antioxidative attribute of hydroethanolic extract of Butea monosperma (Lam.). *Indian J Exp Bio*, 756-66.

Sikkema, J., & Poolman, B. (1995). Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol*, 201-222.

Simas, D., Amorim, S., & Goulart, F. (2017). Los aceites esenciales de las especies de cítricos y sus componentes pueden inhibir o estimular el crecimiento de hongos en la fruta. *El Sevier*, 108-115.

Singer, H., Müller, S., Tixier, C., & Pillonel, L. (2002). Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. *Environ Sci Technol*, 4998.

Smith, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Lett. Appl. Microbiol. 26:118-122. *Microbiol*, 118 - 122.

Strang, M. (2003). *Hot water and hand washing*. Recuperado el 29 de Noviembre de 2017, de www.listproc.com

Suller, M., & Russell, A. (2000). Triclosan and antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 11-8.

Tatarazako, N., Ishibashi, H., & Teshima, K. (2004). Effects of triclosan on various aquatic organisms. *Environ Sci*, 133.

Tavares, W. (2000). Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 3-33.

Uedo, N., Tatsuta, M., Lishi, H., & Sakai, N. (1999). Inhibition by D-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Lett*, 6 - 131.

Ulban, V. (2005). Efectividad de la aplicacion de tenica de lavado de manos contra la bacteria Escherichia coli, utilizada en el quirofano. Guatemala.

Ultee, A., Bennik, J., & Moezelarr, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. *Environ. Microbiol.*, 1561-1568.

UNI, I. (2010). Guía del participante: Curso producción de cítricos. Lima.

USP. (2014). *Farmacopea de los Estados de America*. Baltimore: The United States Pharmacopeial Convention.

Uter, W., & Schnuch, A. (Junio de 2001). Association between occupation and contact allergy to the fragrance mix: a multifactorial analysis of national surveillance data. England.

Villalobos, J., & Mendoza, L. (2015). Contribución de la técnica social de lavado de manos en la reducción de microorganismos transitorios de la piel. *Divulgacion cientifica*, 5.

Villavicencio, H. D., & Ochoa , M. (Enero de 2006). Guia para lavado de las manos. *Prevencion y control de las infecciones intrahospitalarias.* Cusco, Perú.

Vischer, W., & Regos, J. (2005). Antimicrobial spectrum of triclosan, a broad-spectrum antimicrobial agent for topical application. *Zentbl Bakteriol Microbiol*, 89-379.

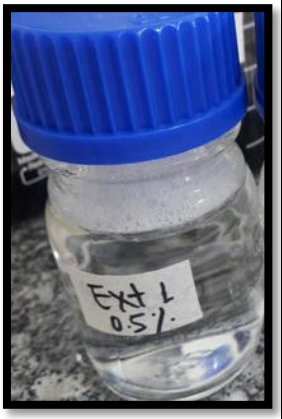
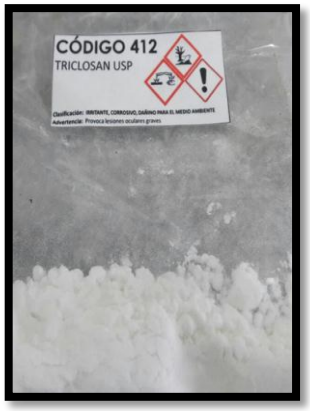
Viuda, M., Ruiz, Y., Fernández, J., & Pérez, J. (2008). Antimicrobial activity of lemon (Citrus lemon L.), mandarin (Citrus reticulata L.), grapefruit (Citrus paradisi L.) and orange (Citrus sinensis L.) essential oils. . *Food Control*, 1130-1138.

Yamamoto, Y., Ugai, K., & Takahashi, Y. (2005). Efficiency of hand drying for removing bacteria from washed hands: comparison of paper towel drying with warm air drying. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 316–20.

Youdim, K., & Deans, S. (1999). Dietary supplementation of thyme (Thymus vulgaris L.) essential oil during the lifetime of the rat: its effects on the antioxidant status in liver, kidney and heart tissues. *Mech Ageing Dev*, 75 - 163.

ANEXOS

ANEXO 1. Activos antimicrobianos evaluados.

EXTRACTO 1	EXTRACTO 2	TRICLOSAN
		

Fuente: elaboración propia

ANEXO 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los activos puros para formular los activos bajo estudio.

Bacterias Gram (+)	**Método**	**CMI mg/L Procide CG**		
		Triclosán	**Extracto 1**	**Extracto 2**
Staphylococcus aureus	**NTC 2455 (tercera actualización)**	0.0079	0.0349	0.0166
Bacillus cereus		0.0349	0.0734	0.0349
Bacterias Gram (-)				
Escherichia coli		0.0349	0.154	0.0166
P. aeruginosa			0.154	0.0166
Levaduras				
Candida albicans		0.0166	0.0349	0.154
Hongos Mohos				
Aspergillus.niguer		0.0166	0.0349	0.154

Nota: La dosificación recomendada corresponde a 3 veces la MIC.

Fuente: elaboración protecncia ingeniera

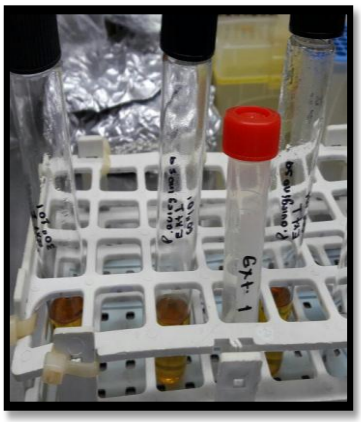
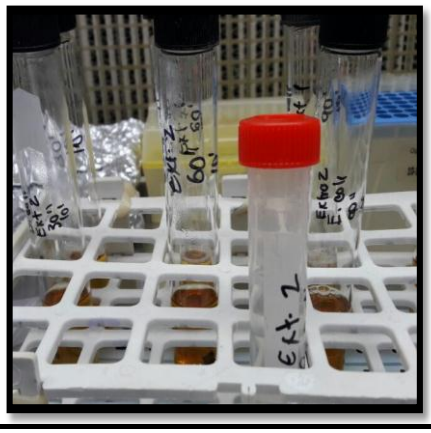
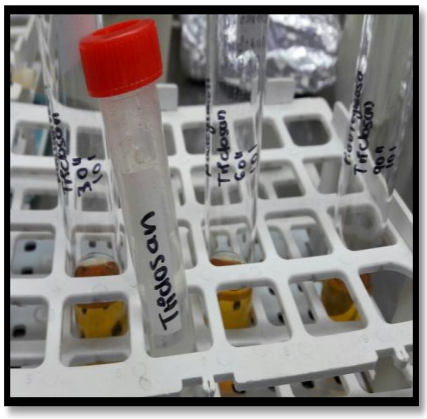
ANEXO 3. Apariencia de los jabones con los activos antimicrobianos a medida de transcurso del tiempo.

Dia 0	Dia 30

Dia 60	Dia 90

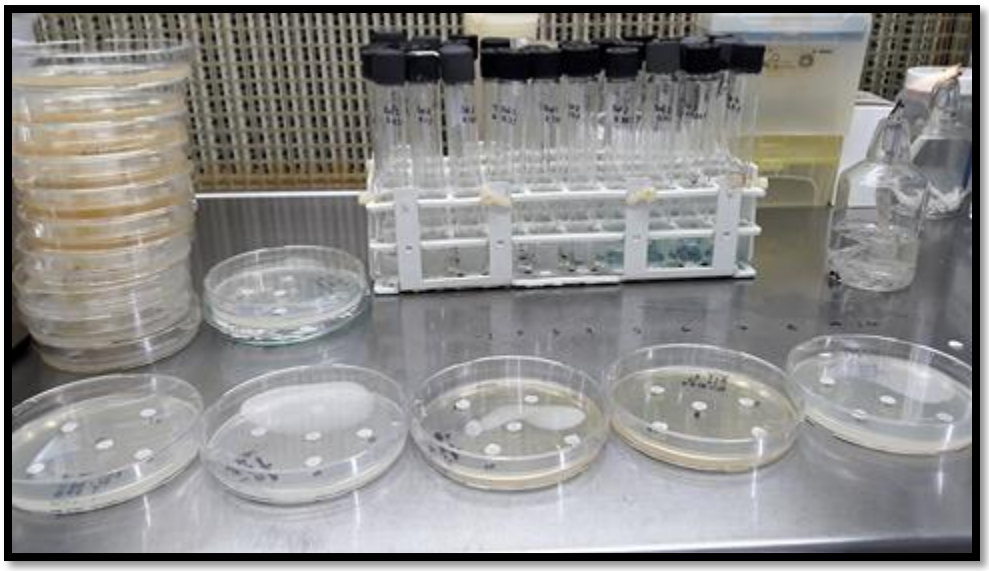
Fuente: elaboración propia

ANEXO 4. Procedimiento de la evaluación de los tiempos y concentraciones de los extractos cítricos y Triclosán (Kelsen Maurer).

Neutralizante de los activos antimicrobianos		
Extracto 1	Extracto 2	Triclosan
		

Fuente: elaboración propia

ANEXO 5. Procedimiento de la evaluación de la actividad antimicrobiana utilizando la técnica de difusión de disco en agar de Kirby-Bauer.

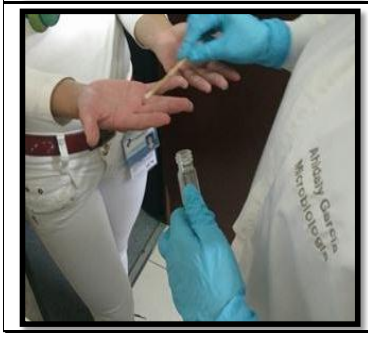


Fuente: elaboración propia

ANEXO 6. Metodología de la OMS (Organización mundial de la Salud) para el correcto lavado de las manos.

Fuente: elaboración propia

ANEXO 7. Procedimiento de la evaluación de los extractos cítricos y el Triclosán en los jabones antibacteriales.

Toma de muestras del lavado de manos en las diferentes areas de la compañía de Protecnica Ingenieria.		
Administrativa	**Laboratorios**	**Operativa**
		

Fuente: elaboración propia

ANEXO 8. Concentraciones obtenidas de la MIC de cada uno de los jabones con los activos antimicrobianos durante los 3 meses en estabilidad.

	CMI (mg/L de producto)						
CONTROL	0	15	30	45	60	75	90
Bacterias Gram (+)							
Staphylococcus aureus	51419	107980	476190	476190	476190	476190	476190
Bacillus cereus	24485	51419	51419	51419	107980	476190	476190
Bacterias Gram (-)							
Escherichia coli	226757	476190	476190	476190	476190	476190	476190
Pseudomona aeruginosa	226757	226757	226757	226757	226757	476190	476190
Levaduras							
Candida albicans	107980	226757	226757	476190	476190	>476190	>476190
Hongos Mohos							
Aspergillus.niger	24485	24485	24485	24485	107980	107980	226757
TRICLOSAN							
Bacterias Gram (+)							
Staphylococcus aureus	51419	51419	107980	226757	226757	226757	510000
Bacillus cereus	<136	11660	51419	51419	51419	>476190	>476190
Bacterias Gram (-)							
Escherichia coli	<136	51419	51419	226757	226757	226757	226757
Pseudomona aeruginosa	226757	226757	226757	226757	226757	226757	>476190
Levaduras							
Candida albicans	226757	226757	476190	476190	476190	476190	>476190
Hongos Mohos							
Aspergillus.niger	11660	24485	24485	24485	24485	24485	107980
EXTRACTO 1							
Bacterias Gram (+)							
Staphylococcus aureus	51419	51419	51419	51419	226757	226757	476190
Bacillus cereus	24485	24485	51419	107980	226757	226757	476190
Bacterias Gram (-)							
Escherichia coli	51419	51419	107980	226757	>476190	>476190	>476190
Pseudomona aeruginosa	226757	226757	226757	226757	226757	476190	476190
Levaduras							
Candida albicans	107980	107980	107980	226757	476190	476190	>476190
Hongos Mohos							
Aspergillus.niger	<136	<136	5552	107980	107980	107980	107980
EXTRACTO 2							
Bacterias Gram (+)							
Staphylococcus aureus	11660	11660	51419	51419	51419	51419	51419
Bacillus cereus	5552	5552	5552	11660	11660	24485	24485
Bacterias Gram (-)							
Escherichia coli	24485	24485	51419	51419	107980	107980	107980
Pseudomona aeruginosa	24485	51419	51419	107980	107980	107980	107980
Levaduras							
Candida albicans	51419	51419	107980	107980	107980	226757	226757
Hongos Mohos							
Aspergillus.niger	136	5552	51419	51419	107980	107980	107980

Fuente: elaboración propia

ANEXO 9. Concentraciones obtenidas de la MIB de cada uno de los jabones con los activos antimicrobianos durante los 3 meses en estabilidad.

	CMB (mg/L de producto)						
CONTROL	0	15	30	45	60	75	90
Bacterias Gram (+)							
Staphylococcus aureus	226757	226757	476190	476190	476190	476190	476190
Bacillus cereus	24485	51419	51419	226757	476190	476190	476190
Bacterias Gram (-)							
Escherichia coli	226757	476190	476190	476190	476190	510000	510000
Pseudomona aeruginosa	226757	226757	226757	226757	226757	476190	510000
Levaduras							
Candida albicans	107980	226757	226757	476190	476190	>476190	510000
Hongos Mohos							
Aspergillus.niger	107980	107980	226757	226757	107980	476190	476190
TRICLOSAN							
Bacterias Gram (+)							
Staphylococcus aureus	51419	107980	226757	226757	226757	226757	510000
Bacillus cereus	51419	51419	107980	107980	226757	510000	510000
Bacterias Gram (-)							
Escherichia coli	<136	226757	226757	226757	476190	476190	476190
Pseudomona aeruginosa	226757	226757	226757	226757	226757	476190	510000
Levaduras							
Candida albicans	226757	226757	476190	476190	476190	476190	510000
Hongos Mohos							
Aspergillus.niger	24485	51419	51419	51419	51419	107980	107980
EXTRACTO 1							
Bacterias Gram (+)							
Staphylococcus aureus	51419	51419	107980	226757	476190	510000	510000
Bacillus cereus	24485	24485	51419	107980	226757	226757	476190
Bacterias Gram (-)							
Escherichia coli	51419	51419	107980	476190	510000	510000	510000
Pseudomona aeruginosa	226757	226757	476190	510000	510000	510000	510000
Levaduras							
Candida albicans	107980	107980	107980	226757	476190	476190	510000
Hongos Mohos							
Aspergillus.niger	<136	<136	5552	107980	107980	107980	107980
EXTRACTO 2							
Bacterias Gram (+)							
Staphylococcus aureus	11660	11660	51419	51419	51419	51419	51419
Bacillus cereus	11660	51419	51419	51419	51419	107980	107980
Bacterias Gram (-)							
Escherichia coli	24485	51419	107980	107980	226757	226757	226757
Pseudomona aeruginosa	24485	51419	107980	107980	107980	107980	107980
Levaduras							
Candida albicans	226757	226757	226757	226757	226757	226757	226757
Hongos Mohos							
Aspergillus.niger	5552	5552	51419	51419	107980	226757	226757

Fuente: elaboración propia

ANEXO 10. Recuentos de las ufc en los tiempos establecidos para el Extracto 1 en cada uno de los microorganismos utilizados en la prueba de Kelsey Maurer.

		Microorganismos				
		S. aureus	***E.coli***	***P.aureginosa***	***B. cereus***	***Moho y Lev.***
		UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml
EXTRACTO 1	0	**1,4E+07**	**1,3E+07**	**5,0E+07**	**1,1E+07**	**1,3E+07**
	30	3,2E+03	2,0E+03	8,5E+02	3,6E+04	2,9E+02
	60	2,8E+03	8,9E+02	0,0E+00	1,3E+03	3,2E+01
	90	9,0E+02	6,6E+02	0,0E+00	4,4E+02	
	0	**3,8E+07**	**1,8E+07**	**3,6E+06**	**3,5E+07**	**5,7E+07**
	30	4,8E+03	1,3E+03	2,6E+01	9,0E+04	5,0E+01
	60	4,2E+03	7,5E+02	0,0E+00	3,1E+03	3,0E+01
	90	1,5E+03	6,7E+02	0,0E+00	8,2E+02	0,0E+00
	0	**8,9E+07**	**7,4E+07**	**2,8E+06**	**7,3E+07**	**3,5E+07**
	30	9,8E+03	1,6E+03	4,3E+01	6,3E+04	1,7E+02
	60	3,5E+03	8,2E+02	0,0E+00	2,2E+03	3,1E+01
	90	1,1E+03	6,6E+02	0,0E+00	6,3E+02	0,0E+00

Unidades logarítmicas basadas en los recuentos obtenidos de las ufc del Extracto 1.

	Microorganismos				
	S. aureus	***E.coli***	***P.aureginosa***	***B. cereus***	***Moho y Lev.***
	Unidades logaritmicas				
EXTRACTO 1	7,15	7,11	7,70	7,04	7,10
	3,51	3,29	2,93	4,56	2,47
	3,45	2,95	0,00	3,11	1,51
	2,95	2,82	0,00	2,64	0,00
	7,58	7,26	6,56	7,54	7,76
	3,68	3,11	1,41	4,95	1,70
	3,62	2,88	0,00	3,49	1,48
	3,18	2,83	0,00	2,91	0,00
	7,95	7,87	6,45	7,86	7,54
	3,99	3,21	1,63	4,80	2,24
	3,54	2,91	0,00	3,34	1,49
	3,04	2,82	0,00	2,80	0,00

ANEXO 10. (Continuación).
Reducción de las Unidades logarítmicas basados en los recuentos obtenidos de las ufc del Extracto 1.

	Microorganismos				
	S. aureus	***E.coli***	***P.aureginosa***	***B. cereus***	***Moho y Lev.***
	Unidades logaritmicas				
EXTRACTO 1					
	3,64	3,82	4,77	2,49	4,64
	3,70	4,16	7,70	3,93	5,60
	4,19	4,30	7,70	4,40	7,10
	3,90	4,14	5,14	2,59	6,06
	3,96	4,38	6,56	4,05	6,28
	4,40	4,43	6,56	4,63	7,76
	3,96	4,66	4,81	3,06	5,31
	4,41	4,96	6,45	4,52	6,05
	4,91	5,05	6,45	5,06	7,54

Fuente: elaboración propia

ANEXO 11. Recuentos de las ufc en los tiempos establecidos para el Extracto 2 en cada uno de los microorganismos utilizados en la prueba de Kelsey Maurer.

		Microorganismos				
		S. aureus	*E.coli*	*P.aureginosa*	*B. cereus*	*Moho y Lev.*
		UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	(10)1
EXTRACTO 2	0	**1,4E+08**	**1,3E+08**	**5,0E+07**	**1,1E+08**	**8,3E+07**
	30	7,10E+03	1,29E+04	3,28E+04	1,70E+04	2,97E+03
	60	1,70E+03	1,10E+03	7,00E+01	9,40E+03	2,85E+03
	90	2,10E+02	7,60E+01	1,00E+01	2,90E+03	2,20E+03
	0	**3,8E+07**	**1,8E+07**	**6,0E+06**	**3,5E+07**	**5,7E+07**
	30	3,00E+03	1,50E+03	2,70E+02	8,90E+03	3,00E+03
	60	1,70E+02	5,20E+01	1,30E+01	3,24E+03	4,00E+03
	90	6,00E+00	2,20E+01	4,00E+00	1,44E+03	2,12E+03
	0	**8,90E+07**	**7,40E+07**	**2,80E+07**	**7,25E+07**	**3,49E+07**
	30	5,05E+03	7,20E+03	1,65E+04	2,95E+04	2,99E+03
	60	9,35E+02	5,76E+02	4,15E+01	6,32E+03	3,43E+03
	90	1,08E+02	4,90E+01	7,00E+00	2,17E+03	2,16E+03

Unidades logarítmicas basadas en los recuentos obtenidos de las ufc del Extracto 2.

	Microorganismos				
	S. aureus	***E.coli***	***P.aureginosa***	***B. cereus***	***Moho y Lev.***
	Unidades logaritmicas				
EXTRACTO 2	8,15	8,11	7,70	8,04	7,92
	3,85	4,11	4,52	4,23	3,47
	3,23	3,04	1,85	3,97	3,45
	2,32	1,88	1,00	3,46	3,34
	7,58	7,26	6,78	7,54	7,76
	3,48	3,18	2,43	3,95	3,48
	2,23	1,72	1,11	3,51	3,60
	0,78	1,34	0,60	3,16	3,33
	7,95	7,87	7,45	7,86	7,54
	3,70	3,86	4,22	4,47	3,47
	2,97	2,76	1,62	3,80	3,53
	2,03	1,69	0,85	3,34	3,33

ANEXO 11. (Continuación)
Reducción de las Unidades logarítmicas basados en los recuentos obtenidos de las ufc del Extracto 2.

	Microorganismos				
	S. aureus	***E.coli***	***P.aureginosa***	***B. cereus***	***Moho y Lev.***
	Unidades logaritmicas				
EXTRACTO 2					
	4,29	4,00	3,18	3,81	4,44
	4,92	5,07	5,85	4,07	4,46
	5,82	6,23	6,70	4,58	4,58
	4,10	4,08	4,35	3,59	4,28
	5,35	5,54	5,66	4,03	4,15
	6,80	5,91	6,18	4,39	4,43
	4,25	4,01	3,23	3,39	4,07
	4,98	5,11	5,83	4,06	4,01
	5,92	6,18	6,60	4,52	4,21

Fuente: elaboración propia

ANEXO 12. Recuentos de las ufc en los tiempos establecidos para el Triclosán en cada uno de los microorganismos utilizados en la prueba de Kelsey Maurer.

		Microorganismos				
		S. aureus	***E.coli***	***P.aureginosa***	***B. cereus***	***Moho y Lev.***
		UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	UFC/ml	(10)1
TRICLOSAN	0	**1,4E+07**	**1,3E+07**	**5,0E+07**	**1,1E+08**	**1,3E+07**
	30	2,5E+02	0,0E+00	5,0E+01	8,0E+03	0,0E+00
	60	3,3E+01	0,0E+00	0,0E+00	7,6E+03	0,0E+00
	90	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	6,3E+03	0,0E+00
	0	**3,8E+07**	**1,8E+07**	**6,0E+06**	**3,5E+07**	**5,7E+07**
	30	1,0E+01	9,0E+01	0,0E+00	2,3E+04	1,0E+00
	60	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	7,8E+03	1,0E+00
	90	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	6,4E+03	1,0E+00
	0	**8,9E+07**	**7,4E+07**	**2,8E+07**	**7,3E+07**	**3,5E+07**
	30	1,3E+02	4,5E+01	2,5E+01	1,6E+04	0,0E+00
	60	1,7E+01	0,0E+00	0,0E+00	7,7E+03	0,0E+00
	90	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	6,3E+03	0,0E+00

Unidades logarítmicas basadas en los recuentos obtenidos de las ufc del Triclosán.

	Microorganismos				
	S. aureus	***E.coli***	***P.aureginosa***	***B. cereus***	***Moho y Lev.***
	Unidades logaritmicas				
TRICLOSAN	**7,15**	**7,11**	**7,70**	**8,04**	**7,10**
	2,40	**0,00**	**1,70**	**3,90**	**0,00**
	1,52	0,00	0,00	3,88	0,00
	0,00	0,00	0,00	3,80	0,00
	7,58	**7,26**	**6,78**	**7,54**	**7,76**
	1,00	1,95	0,00	4,36	0,00
	0,00	0,00	0,00	3,89	0,00
	0,00	0,00	0,00	3,80	0,00
	7,95	7,87	7,45	7,86	7,54
	2,11	1,65	1,40	4,19	0,00
	0,00	0,00	0,00	3,89	0,00
	0,00	0,00	0,00	3,80	0,00

ANEXO 12. (Continuación)
Reducción de las Unidades logarítmicas basados en los recuentos obtenidos de las ufc del Triclosán.

	Microorganismos				
	S. aureus	***E.coli***	***P.aureginosa***	***B. cereus***	***Moho y Lev.***
	Reducción Unidades logaritmicas				
TRICLOSAN					
	4,75	7,11	6,00	4,14	7,10
	5,63	7,11	7,70	4,16	7,10
	7,15	7,11	7,70	4,24	7,10
	6,58	5,30	6,78	3,18	7,76
	7,58	7,26	6,78	3,65	7,76
	7,58	7,26	6,78	3,74	7,76
	5,84	6,22	6,05	3,67	7,54
	7,95	7,87	7,45	3,97	7,54
	7,95	7,87	7,45	4,06	7,54

Fuente: elaboración propia

ANEXO 13. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana utilizando la técnica de difusión de disco Kirby-Bauer para cada uno de los activos antimicrobianos evaluados.

			Microorganismos					
			S. aureus	*E coli*	*P. aeruginosa*	*B. cereus*	*A.niger*	*Candida sp*
			MILIMETROS					
TRICLOSAN	R1							
		0,005	24,0	20,0	0,0	6,0	0,0	1,0
		0,100	25,0	21,0	0,0	6,0	0,0	1,0
		0,125	26,0	21,0	0,0	7,0	0,0	1,0
		0,150	26,0	22,0	0,0	7,0	0,0	2,0
		0,175	26,0	22,0	0,0	8,0	1,0	3,0
		0,200	26,0	22,0	0,0	8,0	1,0	3,0
		0,225	27,0	23,0	0,0	9,0	1,0	3,0
		0,250	29,0	25,0	1,0	10,0	2,0	4,0
		0,275	30,0	26,0	2,0	11,0	2,0	4,0
		0,300	30,0	26,0	4,0	12,0	3,0	6,0
	R2	0,005	23,0	19,0	0,0	5,0	0,0	1,0
		0,100	24,0	20,0	0,0	6,0	0,0	2,0
		0,125	25,0	21,0	0,0	7,0	0,0	2,0
		0,150	25,0	21,0	0,0	7,0	0,0	2,0
		0,175	26,0	22,0	0,0	8,0	1,0	4,0
		0,200	27,0	23,0	0,0	8,0	1,0	4,0
		0,225	27,0	23,0	0,0	9,0	1,0	4,0
		0,250	28,0	24,0	1,0	10,0	2,0	4,0
		0,275	29,0	25,0	2,0	11,0	3,0	4,0
		0,300	30,0	26,0	4,0	12,0	4,0	4,0
	R3	0,005	24	20	0	6	0	1
		0,1	25	21	0	6	0	2
		0,125	26	21	0	7	0	2
		0,15	26	22	0	7	0	2
		0,175	26	22	0	8	1	4
		0,2	27	23	0	8	1	4
		0,225	27	23	0	9	1	4
		0,25	29	25	1	10	2	4
		0,275	30	26	2	11	3	4
		0,3	30	26	4	12	4	5

Fuente: elaboración propia

ANEXO 13. (Continuación)

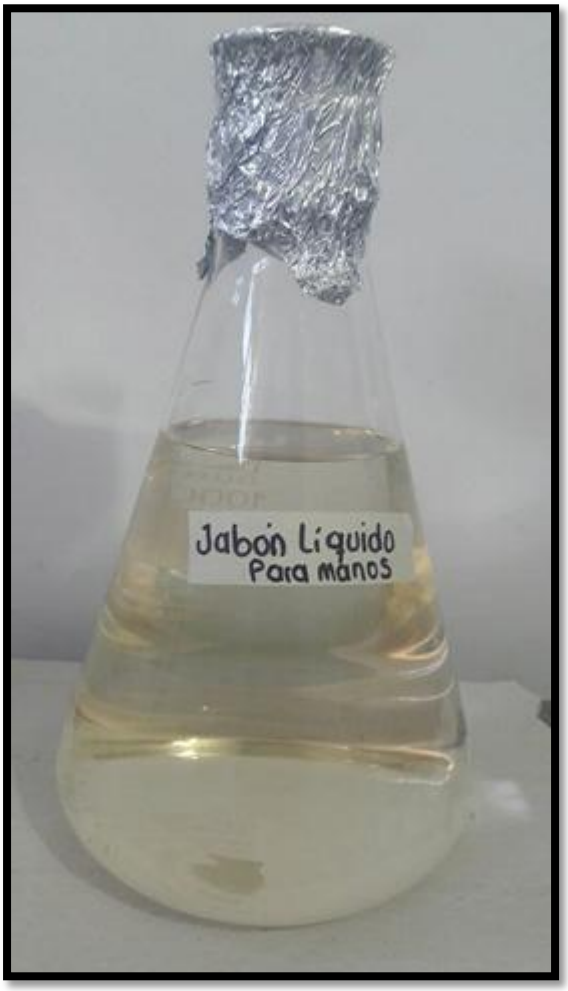
EXTRACTO 1	R1	0,01	2	1	0	1	0	0
		0,10	2	1	0	1	0	0
		0,15	2	1	0	2	0	0
		0,20	2	2	1	2	1	0
		0,25	3	2	1	2	2	0
		0,30	3	2	1	2	2	0
		0,35	4	2	2	2	2	0
		0,40	4	3	2	3	3	1
		0,45	4	3	3	3	6	2
		0,50	5	4	4	3	7	4
	R2	0,005	1	0	0	1	0	0
		0,1	2	1	0	1	0	0
		0,15	2	1	1	1	0	0
		0,2	2	1	1	2	1	0
		0,25	3	2	2	2	3	0
		0,3	3	2	2	2	4	0
		0,35	3	2	3	3	4	0
		0,4	4	3	3	3	4	1
		0,45	4	3	3	3	5	2
		0,5	5	3	4	3	6	4
	R3	0,005	2	1	0	1	0	0
		0,1	2	1	0	1	0	0
		0,15	2	1	1	2	0	0
		0,2	2	2	1	2	1	0
		0,25	3	2	2	2	3	0
		0,3	3	2	2	2	3	0
		0,35	4	2	3	3	3	0
		0,4	4	3	3	3	4	1
		0,45	4	3	3	3	6	2
		0,5	5	4	4	3	7	4

Fuente: elaboración propia

ANEXO 13. (Continuación)

EXTRACTO 2	R1	0,01	1	2	1	0	0	0
		0,10	1	2	1	0	0	0
		0,15	1	2	1	1	0	0
		0,20	1	3	2	1	1	0
		0,25	2	3	2	1	2	0
		0,30	2	3	2	2	2	0
		0,35	2	3	3	2	2	0
		0,40	2	4	3	2	3	1
		0,45	3	4	4	3	6	2
		0,50	3	4	5	3	7	4
		0,005	1	1	1	0	0	0
	R2	0,1	1	2	1	0	0	0
		0,15	1	2	2	1	0	0
		0,2	1	2	2	1	1	0
		0,25	2	3	3	1	3	0
		0,3	2	3	3	2	4	0
		0,35	2	3	4	2	4	0
		0,4	3	3	4	2	4	1
		0,45	3	4	4	3	5	2
		0,5	3	4	5	3	6	4
		0,005	1	2	1	0	0	0
	R3	0,1	1	2	1	0	0	0
		0,15	1	2	2	1	0	0
		0,2	1	3	2	1	1	0
		0,25	2	3	3	1	3	0
		0,3	2	3	3	2	3	0
		0,35	2	3	4	2	3	0
		0,4	3	4	4	2	4	1
		0,45	3	4	4	3	6	2
		0,5	3	4	5	3	7	4

ANEXO 14. Jabón Base Para la preparación con los activos antimicrobianos.



Fuente: elaboración propia

ANEXO 2 Jabones utilizados en el procedimiento del lavado de las manos en las diferentes áreas de la compañía.

Fuente: elaboración propia

ANEXO 16. Datos de la efectividad del lavado de manos con los activos antimicrobianos sobre el personal de las distintas áreas de la compañía.

Área bloque	Producto	Porcentaje (%) de la Efectividad por reducción de unidades logaritmicas.				Personal
		S. aureus	*E.coli*	Aerobios mesòfilos	Mohos y levaduras	
A1	P1	13,02	48,83	12,10	33,77	1
A1	P1	10,78	0,00	11,42	0,00	2
A1	P1	8,83	57,72	8,66	39,04	3
A1	P2	42,86	100,00	40,23	100,00	4
A1	P2	100,00	100,00	62,48	40,21	5
A1	P2	56,63	100,00	49,73	53,06	6
A1	P3	38,09	68,48	32,97	100,00	7
A1	P3	23,63	0,00	25,12	100,00	8
A1	P3	24,39	100,00	22,58	100,00	9
A2	P1	18,79	100,00	14,89	0,00	1
A2	P1	8,23	0,00	6,70	37,58	2
A2	P1	9,66	100,00	7,76	46,28	3
A2	P2	50,95	100,00	51,80	0,00	4
A2	P2	100,00	0,00	100,00	100,00	5
A2	P2	57,92	100,00	60,29	100,00	6
A2	P3	29,94	0,00	35,77	100,00	7
A2	P3	34,95	100,00	40,01	100,00	8
A2	P3	30,44	100,00	37,49	100,00	9
A3	P1	15,07	50,00	23,29	28,62	1
A3	P1	14,48	51,43	13,32	100,00	2
A3	P1	15,47	100,00	17,93	34,86	3
A3	P2	100,00	100,00	31,63	100,00	4
A3	P2	56,43	100,00	32,81	100,00	5
A3	P2	47,73	100,00	32,54	100,00	6
A3	P3	39,72	100,00	30,42	100,00	7
A3	P3	100,00	100,00	30,67	100,00	8
A3	P3	57,45	100,00	30,55	100,00	9

Fuente: elaboración propia

ÁNEXO 17. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO
Director del estudio:

Ing. Jenny Adriana Laguado Sanguino.
Coordinadora de Microbiología

Investigadora:

Estudiante Ahidaly García García.
Aspirante al título en Microbiología industrial

Asesores:

Química. Johanna Donado Moncaleano
Coordinadora del área de aplicaciones cosméticas

Es necesario que lea esta información de forma cuidadosa y completa. Por favor, firme al final del documento, indicando que así ha leído y comprende su información. Es importante que pregunte y aclare dudas.

Objetivo del estudio

Evaluar la efectividad antibacterial del jabón con extractos cítricos contra el triclosán en manos del personal que labora en Protécnica Ingeniería

Introducción

Con el presente estudio se usará una metodología no invasiva para comprobar la eficacia del efecto antibacterial de tres jabones antibacteriales formulados con diferentes activos. Su efecto sobre la piel de las manos está relacionado con la capacidad de sus componentes disminuir significativamente la presencia de microorganismos en las mismas. La información será obtenida a partir de análisis microbiológico realizado a las muestras tomadas mediante un hisopado antes y después del lavado de manos con el producto a evaluar.

Diferentes estudios han demostrado que muchas enfermedades causadas por microorganismos se deben a una higiene deficiente de las manos. Con el propósito de minimizar estas enfermedades, se viene haciendo uso de los llamados jabones antibacteriales los cuales en su mayoría emplean como activo el Triclosán, sin embargo, algunos estudios indican que el triclosán puede inducir resistencia en los microorganismos y tener efectos perjudiciales sobre la salud de los humanos. Lo anterior plantea la necesidad de buscar nuevas alternativas de ingredientes activos funciones a emplearse en jabones antibacteriales. Entre los cuales el presente estudio plantea 2 extractos cítricos como ingredientes de origen natural.

¿Habrá remuneración económica por mi participación?

Usted no se verá sometido a ningún gasto durante el estudio. El producto se le entregara sin ningún costo. Sin embargo, cabe aclarar que usted no recibirá ningún tipo de remuneración económica.
¿Cuántas personas se espera que participen en este estudio?
Por ser un estudio interno, solo participara personal de la compañía, correspondiente a 27 voluntarios de 3 áreas diferentes de la compañía.

Duración del estudio:
El estudio tendrá una duración aproximada de 2 minutos, usted no deberá desplazarse a ningún sitio fuera de la compañía y solo se realizara por una única vez.
¿Qué pruebas se realizarán?
Se realizará el análisis microbiológico a las muestras tomadas mediante un hisopado antes y después del lavado de manos con el producto a evaluar.
¿Qué producto me aplicare?
El producto que será evaluado y aplicado por los voluntarios es una formulación de típica de jabón antibacterial en la cual será incluido alguno de los activos a evaluar (triclosón, extracto 1 o extracto 2). Todos los ingredientes y concentraciones empleados en la formulación se encuentran aprobados en el Cosing Cosmetics.

¿Tienen riesgos las mediciones?
Este estudio no presenta ningún riesgo para su salud, teniendo en cuenta que corresponde a un procedimiento normal de lavado de manos y el producto solo tendrá un contacto con las manos de 30 segundos, posteriormente será enjuagado con abundante agua.

¿Cómo mantendrán la confidencialidad de mis datos personales? ¿Cómo harán para que mi identidad no sea conocida?

La información relacionada con su privacidad será mantenida bajo confidencialidad solo por los investigadores a cargo, quienes tienen la responsabilidad de cuidar la integridad e intimidad de los voluntarios.

En la identificación de las muestras tomadas no será incluido su nombre o alguna otro dato personal que lo relacione directamente, ya que el fin de la investigación es una comparación entre los activos evaluados para lo cual la procedencia de las muestras es irrelevante.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO DE LA EFICACIA DEL EFECTO SEBOREGULADOR DEL HIDRATO TÓNICO TERMAL CONTROL ACNÉ
Yo_____, identificado con la cedula de ciudadanía N° _____de_____, expreso mi consentimiento para participar de este estudio. Declaro que he recibido toda la información necesaria del mismo (objetivos, cuidados, remuneración, efectos adversos). A su vez, la investigadora me ha explicado que cualquier información relacionada con mi identidad será confidencial y que recibiré copia de este documento. He tenido la oportunidad de formular todas las preguntas necesarias para mi entendimiento, concluyendo que el estudio a realizar no implica ningún tipo de riesgo para mi salud.

Dejo constancia que mi participación es voluntaria.

INFORMACIÓN DEL VOLUNTARIO
Nombre
Cedula
Firma

Fecha: _____ Lugar: _____

NOMBRE DEL INVESTIGADOR

Nombre
Cedula
Firma

Fecha: _____ Lugar: _____
Fuente: protecnica ingenieria