

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Propuesta de protocolo para la prevención de contaminación  
microbiológica en proceso de producción de fungicida

Trabajo de graduación presentado por María André Chaves Coronado para  
obtar a un grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología  
Industrial

Guatemala,

2024



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Propuesta de protocolo para la prevención de contaminación  
microbiológica en proceso de producción de fungicida

Trabajo de graduación presentado por María André Chaves para optar a un  
grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología Industrial

Guatemala,

2024

Vo. Bo.

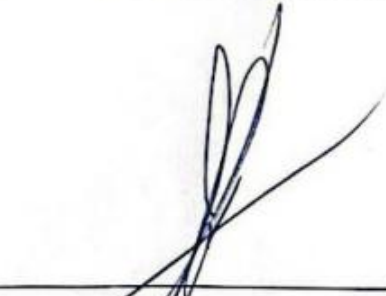
(f) 

Ing. Luis Ernesto Nuñez González M. Sc


Tribunal examinador

(f) 

Ing. Luis Ernesto Nuñez González M. Sc

(f) 

Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano M.Sc

(f) 

Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda M. Sc

Fecha de aprobación: Guatemala, viernes 13 de diciembre 2024

## PREFACIO

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento a mi asesor, Ing. Luis Nuñez, por su orientación, apoyo y experiencia durante todo el proceso de este estudio. Sus recomendaciones y conocimiento han sido fundamentales para el desarrollo y la culminación de este proyecto. También deseo reconocer a los colaboradores de la empresa donde se produjo el fungicida estudiado. Su cooperación y disponibilidad para compartir información y recursos fueron esenciales para el éxito de esta investigación. Sin el apoyo y el compromiso de ambos, este estudio no habría sido posible. Gracias a todos por su contribución y dedicación.

El tema de mi trabajo de graduación se centra en la propuesta de un protocolo para prevenir la contaminación microbiológica en el proceso de producción de fungicida de suspensión concentrada, con el fin de garantizar así la inocuidad y calidad microbiológica de este producto fabricado en una planta de agroquímicos. Gracias a todos por su contribución y dedicación.

# CONTENIDO

Prefacio.....	iii
Lista de Cuadros.....	viii
Lista de Figuras.....	xii
Resumen.....	xiv
<b>I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Antecedentes.....</b>	<b>2</b>
<b>III. Justificación.....</b>	<b>4</b>
<b>IV. Objetivos.....</b>	<b>5</b>
A. Objetivo general:.....	5
B. Objetivos específicos.....	5
<b>V. Marco teórico.....</b>	<b>6</b>
A. Fungicidas.....	6
B. Historia de los fungicidas.....	6
C. Ingredientes comunes en fungicidas químicos.....	7
1. Ingrediente activo.....	7
2. Espesante.....	8
3. Antiespumante.....	8
4. Adhesivo.....	9
5. Dispersantes.....	9
6. Colorantes.....	9
D. Balance de materia teórico de proceso de producción de fungicida estudiado.....	10
E. Balance de energía teórico de proceso de producción de fungicida estudiado.....	11
F. Diagrama de flujo de proceso de producción de fungicida.....	11
G. Contaminación microbiológica en procesos de producción.....	12

H.	Limpieza y desinfección.....	13
1.	Detergentes .....	13
2.	Desinfectantes .....	14
3.	Validación de limpieza y desinfección de línea de producción .....	15
4.	Métodos analíticos para validación de un proceso de limpieza .....	16
I.	Influencia del agua en la contaminación microbológica en procesos de producción .....	16
J.	Métodos para conteo microbiano .....	17
1.	Recuento en placa por siembra .....	17
2.	Recuento con láminas de inmersión.....	18
K.	Cuantificación de cloro total por método de Spectroquant.....	19
L.	Medición de materia orgánica en superficies o líquidos.....	20
<b>VI.</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>22</b>
A.	Validación de un método de limpieza .....	22
1.	Establecimiento de parámetros a evaluar: .....	22
2.	Diseño de prueba experimental.....	22
3.	Establecimiento de criterios de aceptabilidad .....	22
4.	Desarrollo de pruebas experimentales .....	22
5.	Evaluación de resultados.....	23
B.	Diseño de prueba experimental para validación de proceso de limpieza y desinfección de línea de producción.....	24
1.	Materiales y equipos: .....	24
2.	Procedimiento: .....	24
C.	Proceso de limpieza y desinfección de línea de formulación .....	26
1.	Materiales para línea de formulación:.....	26
2.	Procedimiento de limpieza y desinfección de línea de formulación: .....	26
D.	Limpieza y desinfección de llenadoras de líneas de envasado .....	28
1.	Materiales: .....	28
2.	Procedimiento para limpieza y desinfección de envasadora: .....	28
E.	Determinación de fuentes de contaminación microbológica en materias primas .....	29
1.	Materiales y equipos .....	29
2.	Procedimiento .....	29

F.	Evaluación de contaminación en fungicida antes y después de la implementación de medidas para la prevención de contaminación microbiológica.....	31
1.	Materiales y equipos: .....	31
2.	Procedimiento: .....	31
<b>VII.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>33</b>
A.	Evaluación de las fuentes de contaminación microbiológica .....	33
B.	Validación de método de limpieza y desinfección de la línea de formulación y envasado de fungicida	34
1.	Análisis estadístico de mediciones de URL en línea de formulación.....	34
2.	Definición de puntos críticos en línea de formulación.....	37
3.	Análisis estadístico de mediciones de URL en envasadora .....	39
4.	Definición de puntos críticos en línea de formulación.....	41
C.	Análisis microbiológico del producto .....	43
D.	Medidas implementadas para la prevención de contaminación microbiológica.....	44
E.	Protocolo para la prevención y control de contaminación microbiológica en proceso de producción de fungicida .....	45
1.	Propósito .....	45
2.	Alcance .....	45
3.	Términos y definiciones.....	46
4.	Roles y responsabilidades .....	47
5.	RACI.....	48
6.	Diagrama de actividades para la prevención de contaminación del producto .....	49
7.	Diseño de proceso .....	50
8.	Diseño de equipo e instalaciones .....	52
9.	Programación .....	54
F.	Respuesta a contaminaciones microbiológicas en fungicida .....	55
<b>VIII.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>57</b>
<b>IX.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>64</b>
<b>X.</b>	<b>Recomendaciones.....</b>	<b>65</b>
<b>XI.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>67</b>

<b>XII.</b>	<b>Apéndice .....</b>	<b>70</b>
A.	Datos originales.....	70
B.	Cálculos de muestra .....	77
C.	Cálculos de análisis de error.....	77
D.	Datos calculados.....	79
E.	Balance de materia real .....	81
F.	Balance de energía real.....	82
G.	Metodologías en protocolo de prevención de contaminación microbológica .....	83
1.	Metodología de toma de muestra de agua.....	83
2.	Metodología de limpieza y desinfección en línea de formulación .....	84
3.	Metodología de limpieza y desinfección de envasadora .....	86
4.	Metodología para detección de microorganismos en muestras de agua y producto semiterminado y terminado.....	87
5.	Metodología para hisopado de superficies .....	88
6.	Metodología para cuantificación de cloro en muestras de agua.....	90
H.	Datos de placa de equipos .....	92
<b>XIII.</b>	<b>Glosario .....</b>	<b>94</b>
<b>XIV.</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>95</b>
A.	Fotografías.....	95

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Formulación de fungicida y recuento total aeróbico por cada cada materia prima .....	33
<b>Cuadro 2.</b> Análisis de cloro total y recuento total aeróbico de agua industrial en diferentes puntos de muestreo .....	33
<b>Cuadro 3.</b> Puntos que cumplen con el de unidades relativas de luz antes y después del proceso de limpieza y desinfección en línea de formulación .....	34
<b>Cuadro 4.</b> Definición de puntos críticos en formulación según el promedio de URL .....	37
<b>Cuadro 5.</b> Definición de puntos críticos en línea de formulación y criterios de su selección.....	37
<b>Cuadro 6.</b> Puntos que cumplen con el de unidades relativas de luz antes y después del proceso de limpieza y desinfección en envasadora .....	39
<b>Cuadro 7.</b> Definición de puntos críticos según el promedio de URL en envasadora.....	41
<b>Cuadro 8.</b> Definición de puntos críticos en envasadora y criterios de su selección.....	42
<b>Cuadro 9.</b> Análisis microbiológico de producto semiterminado.....	43
<b>Cuadro 10.</b> Análisis microbiológico de producto terminado .....	43
<b>Cuadro 11.</b> Medidas implementadas para la prevención de contaminación microbiológica .....	44
<b>Cuadro 12.</b> Responsables de actividades del proceso de prevención de contaminación microbiológica .....	48
<b>Cuadro 13:</b> Programación de medidas de control de contaminación microbiológica.....	54
<b>Cuadro 14.</b> Conteo aeróbico total de cada materia prima .....	70
<b>Cuadro 15.</b> Unidades relativas de luz en puntos de muestreo de línea de formulación .....	71
<b>Cuadro 16.</b> Unidades relativas de luz en puntos de muestreo de envasadora .....	73
<b>Cuadro 17.</b> Láminas de inmersión resultantes de análisis de agua .....	75
<b>Cuadro 18.</b> Conteo microbiológico de muestras de producto semiterminado .....	76
<b>Cuadro 19.</b> Conteo microbiológico de producto terminado.....	76
<b>Cuadro 20.</b> Promedio y desviación estándar de recuento total aeróbico de materias primas .....	79
<b>Cuadro 21.</b> Análisis de error de nivel de limpieza en línea de formulación .....	80

<b>Cuadro 22.</b> Análisis de error de nivel de limpieza en envasadora .....	80
<b>Cuadro 23.</b> Análisis de error de conteo total aerobio en producto semiterminado .....	80
<b>Cuadro 24.</b> Análisis de error de conteo total aerobio de producto terminado.....	81
<b>Cuadro 25.</b> Luminómetro.....	92
<b>Cuadro 26.</b> Dispositivo de muestreo de superficie MVP ICON® (Hisopos) .....	92
<b>Cuadro 27.</b> Spectroquant.....	92
<b>Cuadro 28.</b> Incubadora.....	93
<b>Cuadro 29.</b> Campana de flujo laminar .....	93

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Balance de materia teórico general de producción de fungicida .....	10
<b>Figura 2.</b> Balance de energía teórico de producción de fungicida .....	11
<b>Figura 3.</b> Diagrama de flujo de proceso de producción de fungicida.....	11
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de acción de detergente .....	13
<b>Figura 5.</b> Tipos de Validación.....	15
<b>Figura 6.</b> Método de conteo por siembra.....	18
<b>Figura 7.</b> Láminas de inmersión para presencia de microorganismos. ....	19
<b>Figura 8.</b> Análisis fotométrico con instrumentos y kits de Spectroquant.....	19
<b>Figura 9.</b> Luminómetro MVP ICON®.....	20
<b>Figura 10.</b> Reacción bioluminiscente durante la desfosforilación del ATP .....	21
<b>Figura 11.</b> Representación gráfica de los puntos de muestro. ....	24
<b>Figura 12.</b> Análisis de datos, gráfica de caja antes y después de proceso de limpieza y desinfección. <b>Nota.</b> La gráfica se generó en “Minitap-Software Estadístico”. Se observa una mayor dispersión en los datos antes de la implementación del proceso de limpieza. ....	35
<b>Figura 13.</b> Informe de capacidad de proceso de limpieza y desinfección en línea de formulación. 35	
<b>Figura 14.</b> Gráfica de repetibilidad de mediciones de URL en línea de formulación después de la implementación del proceso de limpieza. ....	36
<b>Figura 15.</b> Representación gráfica de puntos críticos en línea de producción .....	38
<b>Figura 16.</b> Gráfica de caja antes y después de proceso de limpieza y desinfección en envasadora. 39	
<b>Figura 17.</b> Informe de capacidad de proceso de limpieza y desinfección en envasadora .....	40
<b>Figura 18:</b> Gráfica de repetibilidad de mediciones de URL en envasadora.....	40
<b>Figura 19.</b> Representación gráfica de puntos críticos en envasadora.....	42
<b>Figura 20.</b> Diagrama de actividades para la prevención de contaminación microbiológica .....	49
<b>Figura 21.</b> Balance de materia real de producción de fungicida .....	81

<b>Figura 22.</b> Balance de energía real de producción de fungicida .....	82
<b>Figura 23.</b> Hisopo para BioControl MVP Icon .....	88
<b>Figura 24 .</b> Activación del hisopo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida .....	89
<b>Figura 25.</b> Inserción del hisopo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida	89
<b>Figura 26.</b> Prueba rápida. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida.....	89
<b>Figura 27.</b> Muestra 1 agua de cisterna. El color rosado indica presencia de cloro en el agua. Lugar: laboratorio de empresa productora de fungicida .....	95
<b>Figura 28.</b> Muestra 1 de tanque de almacenamiento de agua tratada. La falta de color indica la ausencia de cloro en el agua. Lugar: laboratorio de empresa productora de fungicida.....	95
<b>Figura 29.</b> Tanque B1. Preparación de goma xantana, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida.....	96
<b>Figura 30.</b> Tolva de descarga de sólidos de tanque B1, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida.....	96
<b>Figura 31.</b> Válvula V9 a la salida de tanque B1, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida .....	97
<b>Figura 32.</b> Bomba de succión en primer piso de planta, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida .....	97
<b>Figura 33.</b> Válvula V1, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida.....	98
<b>Figura 34.</b> Válvula V3, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida.....	98
<b>Figura 35.</b> Tonelito, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida.....	99
<b>Figura 36.</b> Tolva de descarga de tanque 2, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida.....	99
<b>Figura 37.</b> Tanque A1, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida.....	100

<b>Figura 38.</b> Tanque A2, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida.....	100
<b>Figura 39.</b> Tanque A3, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida.....	101
<b>Figura 40.</b> Tanque A4, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida.....	101
<b>Figura 41:</b> cilindros de envasadora, punto de muestreo. Lugar: área de envasado de empresa productora de fungicida.....	102
<b>Figura 42.</b> boquillas de envasadora, punto de muestreo. Lugar: área de envasado de empresa productora de fungicida.....	102
<b>Figura 43.</b> manguera de envasadora, punto de muestreo .....	103
<b>Figura 44.</b> Tubería 1 hacia envasadora, punto de muestreo .....	103
<b>Figura 45.</b> Depósito superior de envasadora, punto de muestreo.....	104

## RESUMEN

El presente trabajo presenta un protocolo destinado a prevenir la contaminación microbiológica en el proceso de producción de un fungicida de suspensión concentrada en una planta de agroquímicos. Para esto se realizó el análisis de identificación de fuentes de contaminación microbiológica, el cual reveló que la principal fuente de contaminación era el agua utilizada en el proceso de producción. Esta presentó un recuento total aeróbico que superaba los límites aceptables. La ausencia de cloro en el agua tratada contribuyó a este problema, por lo que se implementó la dosificación de hipoclorito de sodio para mitigar el riesgo de contaminación y asegurar la inocuidad del producto. Luego, se validó un método de limpieza y desinfección utilizando mediciones de ATP para garantizar la inocuidad de los equipos y del producto final, obteniendo un 100 % de eficacia. Además, el proceso mostró robustez con un Cpk de 3.26 en formulación y 1.43 en envasadora, ambos superiores al mínimo aceptable ( $Cpk > 1.33$ ). Por último, se realizó análisis microbiológicos del producto semiterminado y terminado para confirmar inocuidad. Los recuentos microbiológicos en el producto semiterminado y terminado se redujeron a niveles inferiores a 10 UFC/mL, lo que sugiere niveles de contaminación prácticamente nulos y el cumplimiento de los estándares de calidad de la empresa. El protocolo propuesto aborda eficazmente la contaminación microbiológica, asegurando la inocuidad del producto a través del control riguroso de la calidad del agua, prácticas efectivas de limpieza y desinfección, y pruebas microbiológicas.

## ABSTRACT

This work presents a protocol aimed at preventing microbiological contamination in the production process of a concentrated suspension fungicide in an agrochemical plant. To achieve this, an analysis was conducted to identify sources of microbiological contamination, which revealed that the main source of contamination was the water used in the production process. The water showed a total aerobic count that exceeded acceptable limits. The absence of chlorine in the treated water contributed to this issue, so sodium hypochlorite dosing was implemented to mitigate the risk of contamination and ensure the safety of the product. Subsequently, a cleaning and disinfection method was validated using ATP measurements to ensure the safety of the equipment and the final product, achieving 100% effectiveness. Additionally, the process demonstrated robustness with a Cpk of 3.26 in formulation and 1.43 in packaging, both exceeding the minimum acceptable value ( $Cpk > 1.33$ ). Finally, microbiological analysis of the semi-finished and finished product was conducted to confirm safety. Microbiological counts in the semi-finished and finished product were reduced to levels below 10 CFU/mL, indicating practically zero contamination levels and compliance with the company's quality standards. The proposed protocol effectively addresses microbiological contamination, ensuring product safety through rigorous water quality control, effective cleaning and disinfection practices, and microbiological testing.

# I. Introducción

Los fungicidas se han vuelto prominentes en el sector agrícola, pues protegen a los cultivos de enfermedades y plagas que pueden afectar la seguridad alimentaria, como la rentabilidad de la industria agrícola. La contaminación microbiológica en el proceso de producción de fungicidas representa no solo una amenaza para su calidad, sino que también para el medio ambiente y la salud pública, por la relación directa que tiene con la protección de los cultivos. Esto pues, los fungicidas son eficaces contra determinados patógenos transmitidos por el suelo de diferentes cultivos y controlan enfermedades que se avanzan desarrollan en el mismo (Clark, 2018).

Cabe mencionar que, la goma xantana es un componente presente dentro del fungicida estudiado. Esta sustancia es un polisacárido compuesto de glucosa, manosa y ácido glucurónico producido por fermentación bacteriana o sintéticamente y es utilizada en el fungicida como espesante y gelificante (Perscador, 2022). Esto a su vez, es una fuente de nutrientes para la mayoría de los microorganismos, por lo que la formulación propicia la susceptibilidad del producto a un potencial crecimiento microbiológico, afectando las propiedades de este. Esto puede resultar en la pérdida de lotes enteros o la necesidad de un tratamiento de este, lo que conlleva a un efecto económico para la empresa productora, como daños en su reputación.

Por ello, para evitar la contaminación microbiológica en un fungicida, es necesario desarrollar un protocolo que englobe actividades para controlarla y prevenirla. Un protocolo, en este contexto, se define como un conjunto detallado de procedimientos y directrices que se deben seguir para prevenir, detectar y controlar la contaminación microbiológica. El protocolo propuesto en este trabajo debe abarcar desde la identificación de fuentes potenciales de contaminación hasta la implementación de medidas correctivas y de prevención, asegurando la calidad del producto final, según establecido por la empresa.

Para el monitoreo y control de la contaminación microbiológica en la producción de un fungicida, se pueden diversas técnicas de control. Uno de estos es el análisis microbiológico de muestras de agua, materias primas, producto semiterminado y producto terminado, mediante cultivos en medios selectivos como el PCA, que permite detectar y cuantificar microorganismos. Además, se pueden aplicar métodos de limpieza y desinfección en las líneas de producción, así como realizar análisis para evaluar la inocuidad en las superficies de estos equipos.

## II. Antecedentes

### **Estudio de caracterización de la calidad microbiológica y fisicoquímica del agua utilizada en la industria de alimentos**

En un estudio realizado bajo un convenio interadministrativo en Colombia para mejorar la seguridad alimentaria, se evaluó la calidad higiénico-sanitaria del agua utilizada en una muestra aleatoria de productos de 66 industrias alimentarias ubicadas en ocho departamentos y el Distrito Capital. Este estudio descriptivo transversal analizó 13 parámetros fisicoquímicos, 3 microbiológicos, plaguicidas organofosforados y carbamatos, y 10 metales. Se encontró que el agua en el 4,5 % de las industrias presentaba un alto riesgo según las normas para el agua potable, el 34,8 % tenía un riesgo medio, el 16,7 % un riesgo bajo, y el 43,9 % no presentaba riesgo. Los parámetros más frecuentemente fuera de norma fueron los microbiológicos y el cloro residual. Los resultados sugieren que el agua de muchas industrias podría afectar la calidad de los alimentos y actuar como un medio de transmisión de patógenos, destacando la necesidad de implementar un programa continuo de monitoreo y control (Silvia, et al, 2007).

### **Métodos convencionales, rápidos y alternativos para el control microbiológico de la higiene de superficies**

En el estudio de Montañez (2013) de la Universidad Autónoma de Barcelona, se compararon métodos para controlar la contaminación microbiana en superficies textiles y metálicas. Se evaluaron tres técnicas para contar *Staphylococcus aureus* en algodón: cultivo convencional, microscopía de epifluorescencia directa (DEM) y PCR en tiempo real (RTi-PCR). El cultivo mostró mayor sensibilidad, seguido por RTi-PCR, mientras que la DEM resultó menos eficiente y más laboriosa. Se probó la eficacia de detergentes combinados con desinfectantes para eliminar *S. aureus* y *Candida albicans* en textiles, encontrando que los detergentes en polvo con hipoclorito de sodio fueron los más efectivos, especialmente a temperatura ambiente. También se usó la DEM para evaluar el fago P100 en el control de biofilms de *Listeria monocytogenes* en acero inoxidable, demostrando que el fago P100 era efectivo para disgregar los biofilms, siendo una herramienta útil para controlar la contaminación en superficies metálicas.

### **Guía para la implementación de un sistema de inocuidad de alimentos según norma ISI 22000:2005 en una industria de alimentos.**

La guía elaborada por Orellana Valdéz (2018) de la Universidad de San Carlos de Guatemala tiene como objetivo apoyar a la industria alimentaria en la mejora de la calidad e inocuidad de los alimentos, desde la producción primaria hasta el consumo final. Un alimento se considera inocuo cuando no causa daño al consumidor y debe cumplir con tres factores de calidad: estándares de calidad higiénica, valor nutritivo y aceptación sensorial y cultural. Según la guía, para garantizar alimentos libres de contaminación, las empresas deben desarrollar una infraestructura efectiva y flexible que estandarice sus procesos de producción y administrativos, asegurando así la satisfacción del cliente. La guía proporciona una herramienta de gestión para implementar la norma ISO 22000:2005, facilitando a las industrias de alimentos el cumplimiento de estándares exigentes sin necesidad de contratar consultoría externa.

### **III. Justificación**

El uso de fungicidas es una práctica común y esencial en la agricultura moderna, pues se emplean para controlar el crecimiento de hongos que puedan afectar el crecimiento de cultivos, disminuyendo el rendimiento agrícola, amenazando la seguridad alimentaria y la satisfacción la demanda creciente de alimentos. Por ello, los protocolos de prevención de contaminación microbiológica son necesarios en el proceso de fabricación de fungicidas a nivel global, para no afectar su calidad.

En el contexto de Guatemala, la agricultura representa una parte significativa en la economía de Guatemala; según estimaciones del 2021 por la Cámara de Industria de Guatemala, este sector general 400 000 empleos directos y genera 40 millones de quetzales al Producto Interno Bruto del país (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, 2023). Por ello, el uso de fungicidas es esencial para la protección de los cultivos. La presencia de contaminantes puede comprometer la efectividad del producto, lo que genera pérdidas económicas para las empresas debido a la retira de productos del mercado o su falta de liberación y daños a la reputación de la marca.

La contaminación microbiológica de los fungicidas puede deberse a causas como el manejo inadecuado de materias primas, deficiencia en las condiciones de producción, y falta de controles de calidad. Por ello, es de suma importancia desarrollar un protocolo de prevención que garantice que todas las etapas del proceso cumplan con los estándares de calidad. La implementación de este protocolo no solo mantendrá la calidad establecida del producto, sino que también evitará las pérdidas económicas por productos contaminados. En particular, en la empresa en cuestión, se ha detectado la contaminación en un lote del fungicida estudiado, lo que en esa ocasión llevó a la imposibilidad de liberarlo al mercado. Esta situación resaltó la urgencia de prevenir futuros incidentes similares.

Adoptar un protocolo para la prevención de contaminación microbiológica ayuda a asegurar que el fungicida cumpla con los estándares de calidad exigidos por la empresa. Es por esto que, en el presente trabajo, se propone un protocolo para la prevención de contaminación microbiológica en el proceso de producción del este fungicida. Este incluye análisis de materia prima, metodología de limpieza y desinfección de la línea de producción, así como análisis de control de productos semiterminados y terminados. Además, establece una base para futuras investigaciones y mejoras continuas en la industria química. Asimismo, el protocolo desarrollado puede servir como modelo para aplicar en procesos de producción de otros productos, ampliando su impacto y utilidad en la industria en general.

## **IV. Objetivos**

### **A. Objetivo general:**

Proponer un protocolo para prevenir la contaminación microbiana en el proceso de producción de fungicida de suspensión concentrada, con el fin de garantizar así la inocuidad y calidad microbiana de este producto fabricado en una planta de agroquímicos.

### **B. Objetivos específicos**

1. Evaluar las fuentes de contaminación microbiana en el proceso de producción de fungicida, particularmente en el agua y principales materias primas; por análisis microbianos para establecer medidas preventivas.
2. Validar un método de limpieza y desinfección de la línea de producción de fungicida, empleando la medición de adenosina trifosfato (ATP) como indicador de contaminación orgánica; para garantizar la inocuidad de los equipos de producción y del producto.
3. Realizar análisis microbianos del producto semiterminado y terminado para confirmar su calidad en sus etapas de producción luego de establecer las medidas de prevención de contaminación microbiana.

## V. Marco teórico

### A. Fungicidas

La palabra “fungicida” tiene su origen de las palabras latinas “fungus” y “caedo”. La primera hace referencia a “hongos” y la segunda a “matar”. Por ello, un fungicida es un agente o producto químico capaz de eliminar diferentes tipos de hongos. De acuerdo con este significado, los agentes físicos como la luz ultravioleta y el calor deben también deberían considerarse fungicidas. Sin embargo, en el uso común, el significado se limita a los productos químicos (Kulkarni, 2020).

### B. Historia de los fungicidas

El azufre es el fungicida más antiguo conocido y se puede encontrar en estado elemental cerca de manantiales termales y regiones volcánicas en muchas partes del mundo. A temperatura ambiente, el azufre es un sólido suave y de color amarillo brillante. Se nombraba al azufre como un elemento "que aleja las plagas" en el siglo IX a. C. Sin embargo, no fue hasta 1802 que el azufre, aplicado como polvo finamente molido, se utilizó en la agricultura para controlar el mildiu (enfermedades criptogámicas que atacan a las plantas) en los árboles frutales (Gianessi y Reigner, 2005).

En la década de 1840, en Francia, el azufre se convirtió en un fungicida de gran importancia para combatir el mildiu en las uvas, una enfermedad que se introdujo desde América del Norte en 1845 y redujo la producción de vino francés en un 80 % para 1854. El azufre se utilizó extensamente en los viñedos, y para 1858, la producción de uvas para vino en Francia regresó a su nivel anterior. La acción fungicida del azufre es compleja y funciona principalmente en el proceso de respiración de las plantas (Gianessi y Reigner, 2005).

En 1878, otra enfermedad de las uvas, el mildiu veloso, llegó a las uvas francesas desde América, y nuevamente la producción de vino se vio gravemente afectada. En 1885, se descubrió accidentalmente un fungicida eficaz, la mezcla de Burdeos, cuando el botánico francés Alexis Millardet observó que las uvas rociadas con una mezcla de cal y sulfato de cobre para disuadir a los ladrones estaban saludables, mientras que las plantas cercanas estaban enfermas (Gianessi y Reigner, 2005).

La mezcla de Burdeos demostró ser efectiva contra el *mildiu veloso* de las uvas, el tizón tardío de las papas y muchas otras enfermedades. Sin embargo, durante la Primera Guerra Mundial en 1916, Alemania enfrentó una escasez de cobre, necesario para producir la mezcla de Burdeos, lo que resultó en una epidemia no tratada de tizón tardío de las papas y la muerte de 700,000 civiles alemanes por inanición durante el invierno de 1916-1917 (Gianessi y Reigner, 2005).

En las primeras décadas del siglo XX, los químicos comenzaron a sintetizar miles de nuevos compuestos con propiedades fungicidas, y en la década de 1930 se desarrollaron y patentaron los primeros fungicidas químicos sintéticos como nabam, thiram y zineb. Estos fueron confirmados por su eficacia en 1941. Durante la década de 1950 a 1970, se desarrollaron fungicidas químicos sintéticos más efectivos, como mancozeb, maneb, captan y clorotalonil, que son similares al azufre y al cobre en su aplicación superficial. Por último, a partir de la década de 1970, se introdujeron fungicidas sistémicos que son absorbidos y transportados dentro de la planta, lo que permite tratar enfermedades varios días después de la infección (Gianessi y Reigner, 2005).

## C. Ingredientes comunes en fungicidas químicos

### 1. Ingrediente activo

El ingrediente activo de un fungicida es el componente químico responsable de matar o inhibir el crecimiento de los hongos que afectan a las plantas. Por ello, este ingrediente le da la capacidad al fungicida de controlar las enfermedades fúngicas en las mismas. Los ingredientes activos varían entre diferentes tipos de fungicida, según el uso objetivo de este (McGrath, 2016). Como ejemplos de ingredientes activos se encuentran:

- **Mancozeb:** Este ingrediente activo está diseñado para uso de contacto y como agente protector en una variedad de cultivos. Su acción protectora se debe a su capacidad de interferir en la producción de energía del hongo, mediante la reacción con grupos tiol (-SH) presentes en proteínas esenciales, principalmente enzimas, dentro de las células del hongo. Este mecanismo de acción "multi-sitio" lo convierte en una herramienta para prevenir el desarrollo de resistencia en las poblaciones de hongos (DUWEST Guatemala, S.A., 2022)
- **Clorotalonil:** pertenece al grupo químico de los benzonitrilos. Este fungicida es especialmente efectivo contra diversas familias de hongos, incluyendo Ascomycetos, Basidiomycetos, y hongos imperfectos. actúa como un agente protector que hace efecto a nivel celular bloqueando múltiples puntos clave en los procesos metabólicos de los hongos. Su modo de acción incluye la inhibición de la respiración celular y la producción de ATP. Al impedir estos procesos vitales, este ingrediente evita la germinación de esporas y detiene el crecimiento del micelio, protegiendo así los cultivos de las infecciones fúngicas (SYS Solutions, S.A., 2023).
- **Azoxistrobina:** Actúa inhibiendo la respiración celular de los hongos, lo que lo hace particularmente efectivo en la prevención de la germinación de esporas y el desarrollo inicial del patógeno. La azoxistrobina también tiene actividad translaminar, lo que mejora su

eficacia en cultivos densos, y proporciona un efecto residual prolongado que protege las hojas, retrasando su senescencia y manteniéndolas verdes por más tiempo (Syngenta, 2022).

Cada uno de estos ingredientes tiene un mecanismo específico para combatir los hongos, y de elección debe depender del tipo de hongo que se quiera controlar, el cultivo que se quiere proteger y las condiciones ambientales (McGrath, 2016).

## **2. Espesante**

Un espesante en un fungicida es un tipo de modificador reológico que se emplea para ajustar la viscosidad de la formulación. La viscosidad, que es la medida de la resistencia de un líquido a fluir, estabiliza el producto. De esta forma, el espesante actúa como una barrera que evita la sedimentación y la separación de componentes. Además, contribuye a la estructura del fungicida, asegurando que el producto mantenga una consistencia adecuada para su aplicación. Esto significa que el fungicida no solo se vuelve más estable, sino que también permanece fluido y fácil de aplicar cuando se le aplica una fuerza, garantizando una distribución uniforme y eficaz sobre las superficies tratadas (Croda International Plc, 2024).

Un ejemplo de espesante es la goma xantana, es un polisacárido natural producido mediante la fermentación de azúcares por la bacteria *Xanthomonas campestris*. Este compuesto contribuye a la estabilidad de la mezcla y a la reducción de la formación de espuma, mejorando la consistencia del fungicida. Su presencia facilita una aplicación uniforme al ajustar el patrón de rociado y asegurar una cobertura efectiva, y también mejora la adherencia del fungicida a las plantas y superficies tratadas, optimizando la eficacia del tratamiento (Pescador, 2022).

## **3. Antiespumante**

Un antiespumante también conocido como desespumante, es un aditivo químico utilizado para prevenir la formación de espuma y burbujas en diversos procesos de producción industrial. En el contexto de un fungicida, el antiespumante se aplica para controlar la espuma que puede generarse durante la fabricación y aplicación del producto. La espuma puede interferir en el procesamiento, el llenado, la medición del volumen o alterar la textura del fungicida final. Si bien en algunos casos se puede controlar la espuma mediante la optimización de los procesos, en muchos casos es necesario añadir un antiespumante para minimizar y manejar eficazmente este fenómeno (Grupo PochTeca Guatemala, 2022).

#### **4. Adhesivo**

Un adhesivo es una sustancia química que se añade a las formulaciones de fungicidas o a la mezcla en el tanque de pulverización para mejorar la eficacia del ingrediente activo. Su función principal es optimizar la actividad del fungicida al mejorar la consistencia de la solución y reducir problemas como la deriva del producto. Los adhesivos pueden influir en el rendimiento del fungicida al ajustar el patrón de rociado, el tamaño de las gotas, la calidad de la pulverización y la forma en que el fungicida se mueve en la planta, facilitando su absorción y penetración (Intagri S.C., 2017).

#### **5. Dispersantes**

Los dispersantes son aditivos especializados que se emplean para humedecer, dispersar y estabilizar partículas sólidas en diversas fases continuas, como disolventes, agua y plásticos. Estos aditivos están diseñados para disminuir la viscosidad y mejorar la estabilidad de la dispersión (The Lubrizol Company, 2022).

Aunque las partículas sólidas que se dispersan suelen ser pigmentos, también pueden incluir agentes mateantes basados en sílice, ceras, partículas conductivas (como carbono, grafeno, nanotubos de carbono), rellenos inorgánicos (como carbonato de calcio, talco, barita) o metales preciosos (como oro, plata y platino). En esencia, cualquier partícula sólida que se disperse en una fase continua, ya sea líquida o sólida, puede beneficiarse de estos dispersantes (The Lubrizol Company, 2022).

#### **6. Colorantes**

El colorante en un fungicida se utiliza principalmente para dos propósitos. Primero, facilita la identificación y diferenciación del producto durante la aplicación y el manejo, ayudando a asegurar que el fungicida se aplique en las áreas deseadas y evitando errores. Segundo, puede contribuir a la visibilidad del fungicida sobre las plantas y superficies tratadas, lo que permite una evaluación más precisa de la cobertura y la distribución del producto. La adición de colorante no afecta la eficacia del fungicida, pero mejora la gestión y el control del tratamiento (Intagri S.C., 2017).

## D. Balance de materia teórico de proceso de producción de fungicida estudiado

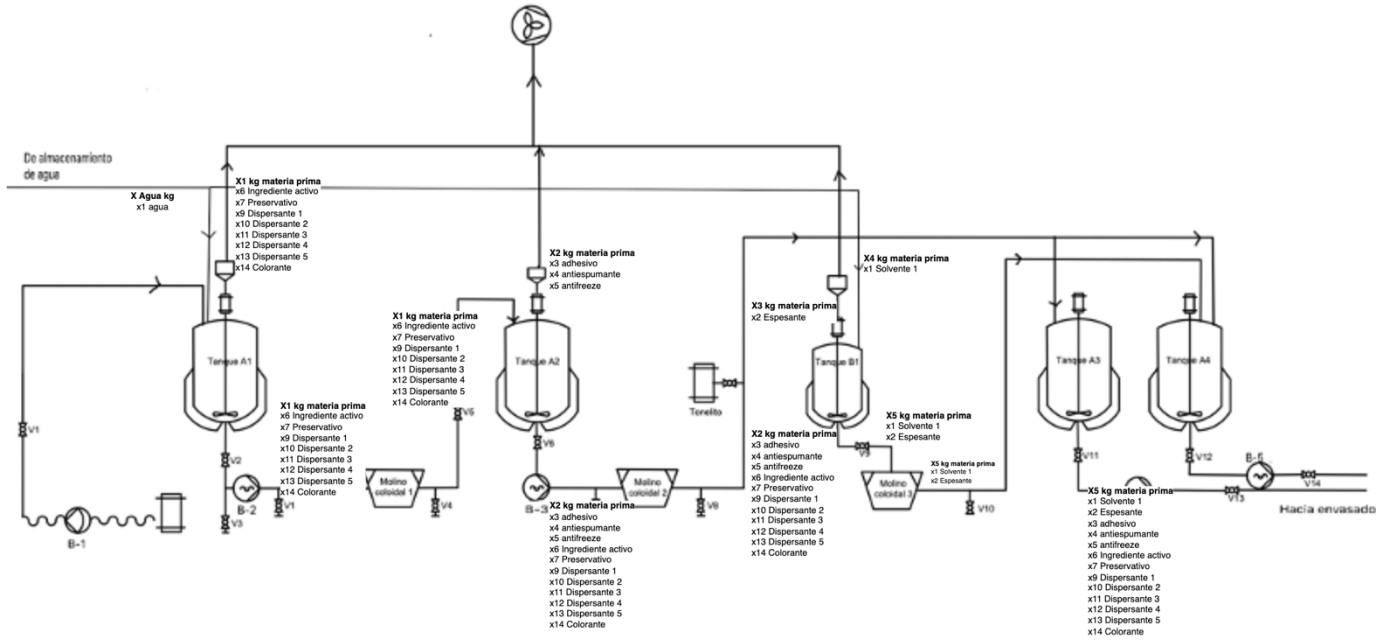


Figura 1. Balance de materia teórico general de producción de fungicida

Nota. Elaboración propia

## E. Balance de energía teórico de proceso de producción de fungicida estudiado

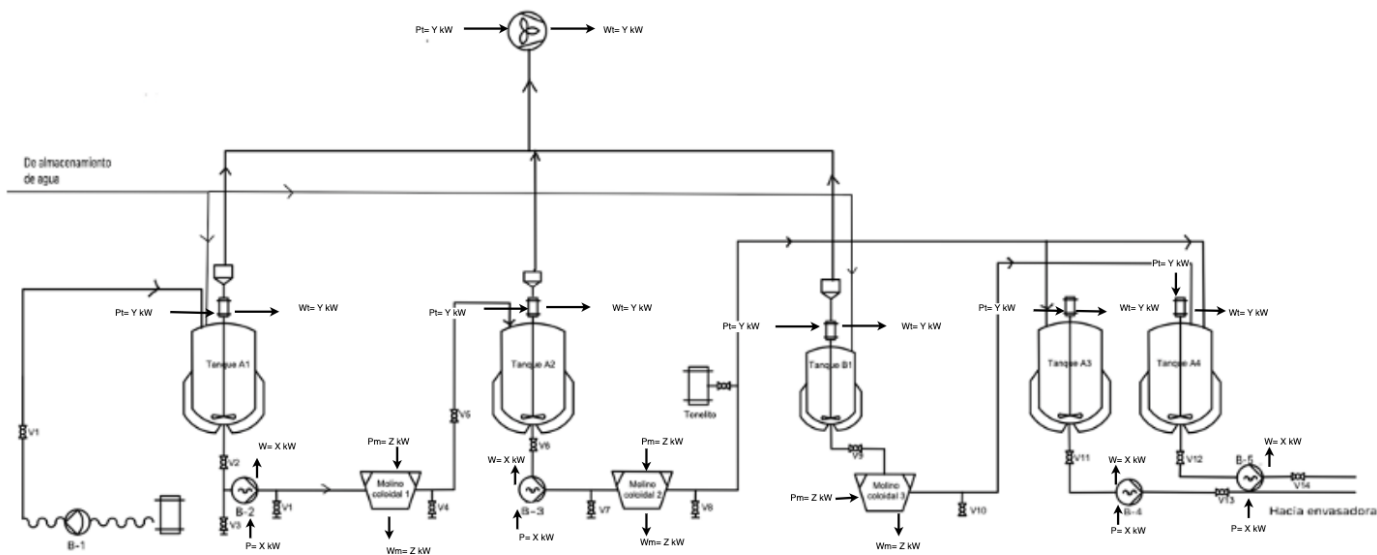


Figura 2. Balance de energía teórico de producción de fungicida

Nota. Elaboración propia

## F. Diagrama de flujo de proceso de producción de fungicida

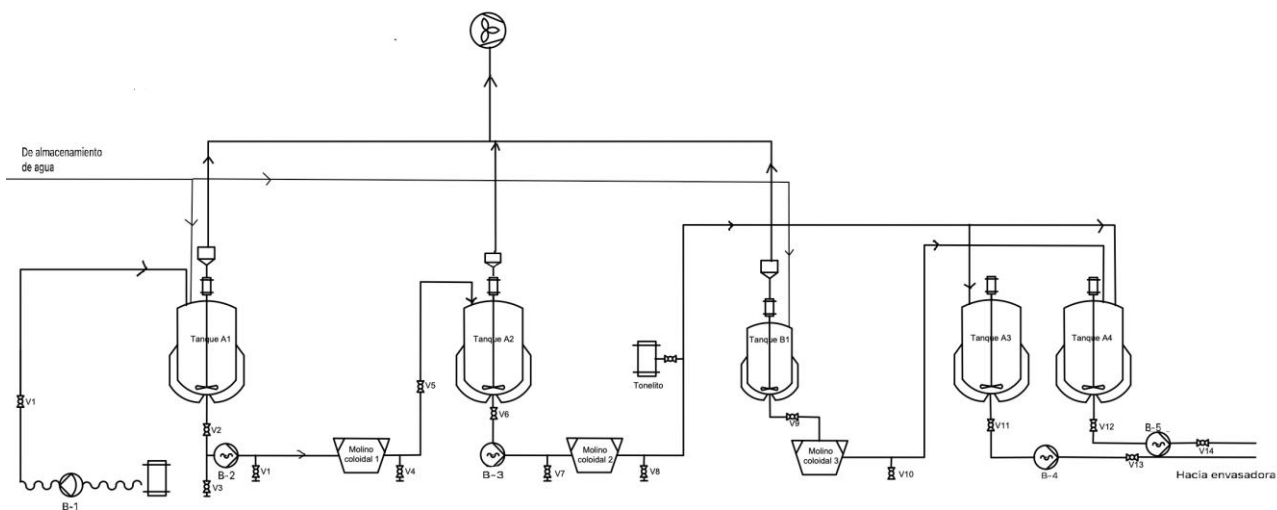


Figura 3. Diagrama de flujo de proceso de producción de fungicida

Nota. Elaboración propia

## **G. Contaminación microbiológica en procesos de producción**

La contaminación de en las diferentes industrias es un problema significativo que puede surgir debido a diversos elementos no deseados, como productos químicos, insectos y microorganismos. En particular, la contaminación microbiana es una preocupación destacada en la industria alimentaria. Algunos de los microorganismos comunes que pueden contaminar los alimentos incluyen *Pseudomonas*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus sp.* y *Campylobacter jejuni* (Chatterjee y Abraham, 2018).

Además, los *biofilms* microbianos representan una amenaza significativa en la industria, ya que muchos microorganismos tienen la capacidad de formar estas películas en presencia incluso de pequeñas cantidades de humedad y nutrientes. Estos biofilms no solo pueden afectar la calidad y seguridad de los productos, sino que también pueden ser la fuente de infecciones clínicas relacionadas con la ingesta de los contaminados, especialmente en alimentos (Chatterjee y Abraham, 2018).

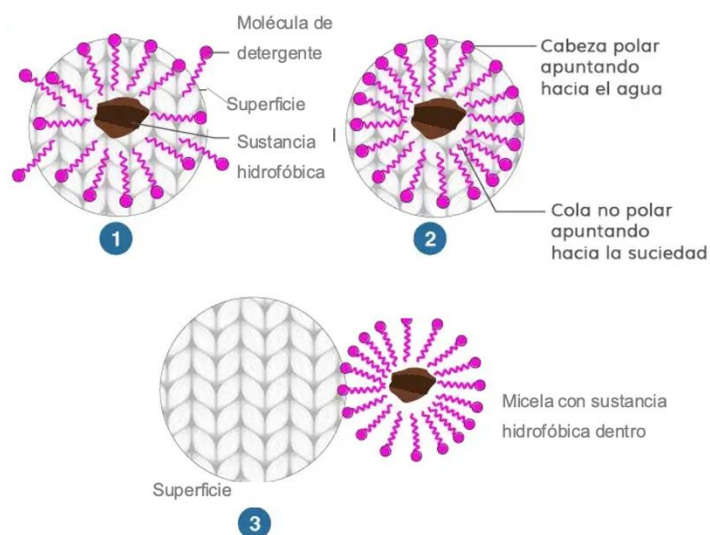
La prevención de la contaminación microbiana es esencial para reducir la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos y para asegurar la calidad de diferentes productos. Entre las medidas preventivas, la limpieza y desinfección adecuadas son fundamentales. Además, es de suma importancia utilizar agua esterilizada en todos los pasos del procesamiento de alimentos para evitar la introducción de microorganismos no deseados (Chatterjee y Abraham, 2018).

El diseño cuidadoso de equipos también influye en la prevención de la contaminación. Los equipos deben ser diseñados de manera que se minimice la posibilidad de crecimiento microbiano en cualquier parte de ellos. La detección temprana del crecimiento microbiano es esencial, y la monitorización regular puede proporcionar una comprensión más profunda de la formación de *biofilms*, lo que permite tomar medidas preventivas de manera oportuna (Chatterjee y Abraham, 2018).

En cuanto a los métodos de descontaminación, se han desarrollado diversas técnicas para garantizar la inocuidad de los productos. Los procedimientos químicos que utilizan ozono son eficaces para la eliminación de microorganismos en alimentos sólidos. Además, se están utilizando técnicas térmicas y no térmicas avanzadas, como el calentamiento por microondas, la tecnología de campo eléctrico pulsado, el procesamiento a alta presión, la tecnología de alta intensidad de luz, el calentamiento óhmico, las técnicas ultrasónicas y los rayos X pulsados en las industrias alimentarias para la conservación de alimentos líquidos (Chatterjee y Abraham, 2018).

## H. Limpieza y desinfección

### 1. Detergentes



**Figura 4.** Mecanismo de acción de detergente

**Nota.** M. Bhairi y Mohan, 2007

Los detergentes son moléculas anfipáticas que contienen tanto grupos polares como hidrofóbicos. Estas moléculas tienen un grupo polar (cabeza) al final de una larga cadena de carbono hidrofóbica (cola). A diferencia de las moléculas puramente polares o no polares, las moléculas anfipáticas exhiben propiedades únicas en el agua. Su grupo polar forma enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua, mientras que las cadenas de hidrocarburos se agregan debido a interacciones hidrofóbicas. Estas propiedades permiten que los detergentes sean solubles en agua. En soluciones acuosas, forman estructuras esféricas organizadas llamadas micelas (Figura 1), cada una de las cuales contiene varias moléculas de detergente. Debido a su naturaleza anfipática, los detergentes pueden solubilizar compuestos hidrofóbicos en agua. Los detergentes también son conocidos como surfactantes porque disminuyen la tensión superficial del agua (M. Bhairi y Mohan, 2007).

## 2. Desinfectantes

Los desinfectantes son sustancias químicas que poseen actividad bactericida contra los microorganismos, logrando al menos una reducción de 4 logaritmos. Tanto microorganismos unicelulares como pluricelulares presentan varios puntos de ataque químico, como ácidos nucleicos y proteínas, enzimas y coenzimas, membranas y sus bombas de transporte. Debido a que los puntos de reacción celular son diversos, los productos químicos actúan como eliminadores de las formas vegetativas y reproductivas de los microorganismos, con una diferenciación de objetivos (Sanga, 2010).

Un buen desinfectante para uso industrial cumple con los siguientes criterios:

- Amplio espectro, capaz de eliminar todos los patógenos.
- Acción rápida para limitar el tiempo de aplicación.
- Inofensivo para los operadores.
- No agresivo con las superficies.
- Fácil de enjuagar.
- No mancha.
- No perjudicial para el tratamiento de aguas residuales.
- Activo incluso en presencia de contaminación residual.

Sin embargo, resulta prácticamente imposible encontrar todas estas características en un solo desinfectante. Es una buena práctica rotar los desinfectantes, ya que el uso de un único desinfectante podría crear presiones selectivas que favorezcan la aparición de cepas menos susceptibles (resistentes) al desinfectante. Aunque este fenómeno se observa en algunos casos conocidos, como hospitales, laboratorios especializados y, en ocasiones, la industria farmacéutica. En la industria alimentaria, la desinfección de una superficie es necesaria o puede indicar algún problema, como la elección del agente desinfectante o el procedimiento operativo (Sanga, 2010).

Entonces, a pesar de que el desinfectante esté funcionando correctamente, hay que rotarlo debido a la mutación de los microorganismos. La mutación, en la que se basa la resistencia, se atribuye a la estabilidad del plásmido, que depende del tamaño del conjunto de plásmidos en la célula y del tiempo o frecuencia de división celular. El plásmido es una estructura autor replicante no nuclear que lleva información genética no esencial para la existencia de la bacteria. Muta fácilmente y, por lo tanto, se cree que es responsable de las mutaciones genotípicas de las bacterias (Sanga, 2010).

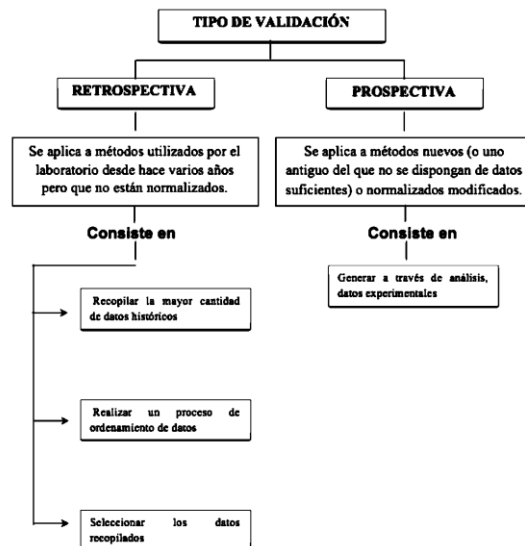
Con el tiempo (varias generaciones de bacterias, es decir, divisiones celulares), la mutación podría establecer una nueva cepa resistente específica. Por lo tanto, se necesita tiempo para desarrollar

resistencia. Sin embargo, la industria alimentaria no puede permitir el tiempo necesario para la mutación. O se desinfecta una superficie o se produce rápidamente un desastre que afecta los alimentos preparados. Por esta razón, el desarrollo de resistencia durante un proceso de fabricación es prácticamente imposible si las operaciones de saneamiento están bien planificadas y se observan puntualmente. El conocimiento de los desinfectantes y la colaboración con un proveedor confiable son factores clave para garantizar un funcionamiento sin problemas y vivir con tranquilidad (Sanga, 2010).

### 3. Validación de limpieza y desinfección de línea de producción

La limpieza tras un proceso de fabricación es fundamental para prevenir la contaminación cruzada y proteger la salud de los pacientes. Por esta razón, la validación de este proceso es un requisito regulatorio y necesario en cualquier empresa. Además, la validación contribuye a obtener productos de calidad y a tener un mejor control sobre los procesos. Es necesario repetir el proceso de limpieza al menos **tres veces** para demostrar su eficacia antes de integrarlo en la rutina, garantizando así que los equipos estén en un estado limpio.

Tradicionalmente, cada principio activo requería un procedimiento de limpieza y validación diferente. Sin embargo, actualmente, adoptando un enfoque basado en el riesgo, se busca que, siempre que sea posible, un único proceso de limpieza se aplique a todos los equipos y productos (Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2016).



**Figura 5.** Tipos de Validación

**Nota.** (Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2016).

#### **4. Métodos analíticos para validación de un proceso de limpieza**

Los métodos analíticos utilizados en la validación de limpieza deben cumplir con ciertos requisitos esenciales. En primer lugar, es importante que estos métodos estén debidamente validados, lo que garantiza su fiabilidad y precisión en las mediciones. Además, deben ser selectivos, lo que implica que deben identificar de manera específica el residuo que se está analizando, evitando interferencias de otros compuestos presentes. Por otro lado, la sensibilidad de los métodos también es importante; deben contar con límites de cuantificación (LOQ) que sean adecuados para medir con precisión los criterios de aceptación establecidos. Este enfoque asegura que los procesos de limpieza sean efectivos y que los productos finales cumplan con los estándares de calidad y seguridad requeridos (Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2016).

### **I. Influencia del agua en la contaminación microbiológica en procesos de producción**

El agua limpia es un líquido sin color, sabor y olor. Bajo condiciones estándar de presión, el agua se congela a 0 °C, y la transición de líquido a gas se realiza a 100 °C. El agua alcanza su máxima densidad a 4 °C, pero esta densidad disminuye cuando la temperatura desciende debido a anomalías conocidas como enlaces de hidrógeno. El átomo de oxígeno en una molécula de agua es electronegativo, generando una carga negativa parcial en un extremo de la molécula y una carga positiva parcial en el otro, dando lugar a los enlaces de hidrógeno. La polaridad de las moléculas determina en gran medida otras propiedades del agua, incluida la disolución de diferentes tipos de sustancias, siendo esta su propiedad más importante (Al-Rub, 2020).

El pH del agua generalmente varía de pH 5 a 8.5. Este rango no suele tener consecuencias graves para la mayoría de los detergentes y desinfectantes. Sin embargo, el agua altamente alcalina o ácida puede requerir agentes amortiguadores adicionales. La industria utiliza agua en los procesos de producción y saneamiento, siendo aproximadamente el 15 % del consumo mundial de agua destinado a la industria. Además, esta puede contener un número significativo de microorganismos. El agua utilizada para limpieza y desinfección debe ser potable y libre de patógenos. Por ello, pueden ser necesarios tratamientos y procesos de saneamiento del agua antes de su uso en regímenes de limpieza (Al-Rub, 2020).

Las impurezas en el agua pueden afectar las funciones de limpieza. Las soluciones de limpieza y desinfección contienen aproximadamente entre un 95 % y un 99 % de agua. Esto pues, esta sustancia

cumple la función de transportar el detergente o desinfectante a la superficie y eliminar los residuos o contaminantes de la misma (Al-Rub, 2020).

Por otro lado, las impurezas en el agua pueden afectar considerablemente el rendimiento del detergente o desinfectante. La dureza del agua es la propiedad química más importante y afecta directamente la eficacia de la limpieza y desinfección. Otras impurezas pueden afectar la superficie en contacto con los alimentos, las propiedades de los depósitos de suciedad o la formación de películas (Al-Rub, 2020).

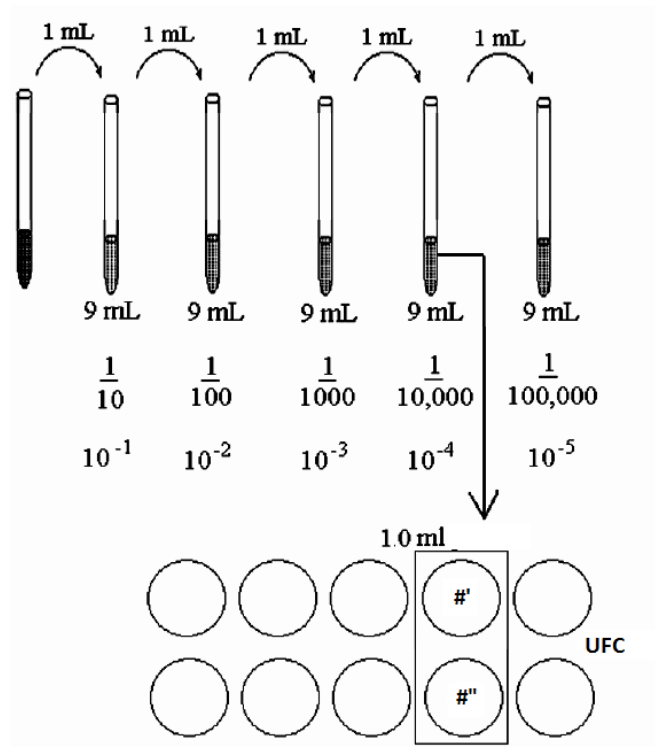
Asimismo, la alcalinidad del agua representa la capacidad cuantitativa de un medio acuoso para reaccionar con iones de hidrógeno. La alcalinidad determina la cantidad de iones en el agua que neutraliza los iones de hidrógeno. En aguas alcalinas, los alcalinos forman los siguientes iones: carbonatos, bicarbonatos, hidróxidos, silicatos, boratos, fosfatos e hidrógeno sulfuros (Al-Rub, 2020).

Por último, cabe mencionar que la dureza del agua es la concentración de cationes metálicos polivalentes en una solución que reacciona en saturación con aniones. La dureza del agua determina la calidad química del agua. Uno de los procedimientos obligatorios en el saneamiento es determinar la dureza del agua utilizada en el proceso. Compuestos diferentes disueltos en agua tienen diferentes propiedades de solubilidad que pueden cambiar al modificar el pH o la temperatura. Los cloruros y nitratos son sales bien solubles en agua y generalmente no precipitan, mientras que los bicarbonatos tienden a precipitar (Al-Rub, 2020).

## **J. Métodos para conteo microbiano**

### **1. Recuento en placa por siembra**

Este método se utiliza para estimar la cantidad de microorganismos presentes en una muestra. Para realizar esto, se toma un volumen conocido de la dilución de la muestra y se siembra uniformemente sobre la superficie de un medio de cultivo sólido, generalmente en una placa Petri. Luego, este medio se incuba según el tipo de medio que se está utilizando. Para el crecimiento de las bacterias aerobias, generalmente a 35-37 °C. Esta incubación suele durar entre 24 y 48 horas, aunque igual puede variar según el tipo de microorganismo que se está cultivando. La técnica proporciona una estimación directa y cuantitativa de la concentración de microorganismos en la muestra, y es ampliamente utilizada en laboratorios de microbiología y en diversas industrias para asegurar la calidad y seguridad microbiológica.



**Figura 6.** Método de conteo por siembra.

**Nota.** Barrios, 2011

Generalmente, se realizan al menos 3 réplicas para cada dilución para asegurar la precisión y reproducibilidad del recuento. Cada placa de Petri representa un resultado individual del recuento. En una placa de una serie de las réplicas, se debe contar la que permita contar claramente el número de colonias. El número de colonias contadas se multiplica por el factor de dilución para estimar el número total de microorganismos en la muestra original. Esto se realiza en cada una de las réplicas. Luego, se calcula el promedio de los resultados, para obtener el conteo final.

## 2. Recuento con láminas de inmersión

Se utiliza para la detección semicuantitativa de microorganismos en superficies y líquidos. Estas láminas están cubiertas con diferentes medios nutritivos, en sus dos lados. Estos lados pueden determinar diferentes parámetros: levaduras y mohos, conteo total de colonias, detección de enterobacterias y detección de coliformes totales / *E coli*.



**Figura 7.** Láminas de inmersión para presencia de microorganismos.

**Nota.** Merck KGaA, 2024

## **K. Cuantificación de cloro total por método de Spectroquant**

La prueba Spectroquant® para cloro libre y total es un método preciso y confiable para medir la concentración de cloro en diferentes tipos de agua, como agua potable, agua de piscinas y otras fuentes. El proceso utiliza un reactivo específico, la dipropil-p-fenilenodiamina (DPD), que, al reaccionar con el cloro libre presente en la muestra, produce un cambio de color. Este cambio se mide utilizando un fotómetro, que evalúa la intensidad del color para determinar la cantidad exacta de cloro en la muestra. Este tipo de análisis garantiza que los niveles de cloro total sean adecuados para la desinfección de agua. Además, agregando un segundo reactivo, se determina la cantidad de cloro total de la muestra ( Merck KGaA, 2024).



**Figura 8.** Análisis fotométrico con instrumentos y kits de Spectroquant.

**Nota.** Merck KGaA, 2024

## L. Medición de materia orgánica en superficies o líquidos

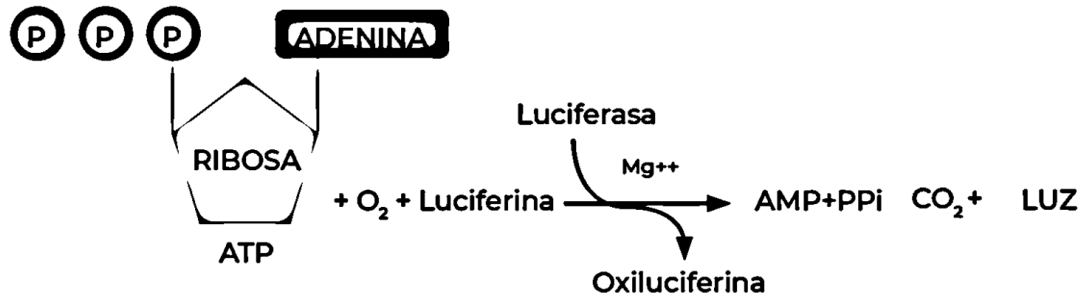
Un luminómetro es un instrumento de medición que se utiliza para detectar la presencia de materia orgánica en muestras de superficies o líquidos a través de una reacción lumínica. Se basa en la química luminiscente, en la cual se produce una señal de luz como resultado de una reacción entre ciertos reactivos. Los luminómetros son comunes en aplicaciones de control de calidad y seguridad alimentaria, así como en investigaciones de biología y microbiología, ya que ofrecen una forma rápida y sensible de medir la limpieza y la presencia de contaminantes (MicroPlanet, 2016).



**Figura 9.** Luminómetro MVP ICON®

**Nota.** MicroPlanet, 2016

El funcionamiento de un luminómetro se basa en una reacción química que produce luz mediante la interacción entre el ATP (Trifosfato de Adenosina) y un sistema enzimático compuesto por luciferina y luciferasa (Figura 5). El ATP, que está presente en células de organismos vivos como bacterias y hongos, se mezcla con estos reactivos en el luminómetro. La luciferina, en presencia de ATP y catalizada por la luciferasa, sufre una reacción de oxidación que genera un compuesto excitado que, al volver a su estado basal, emite luz visible. La intensidad de esta luz es proporcional a la cantidad de ATP en la muestra, lo que a su vez indica la cantidad de materia orgánica presente. Cuanta más luz se produce, mayor es la cantidad de ATP y, por ende, mayor es la suciedad o residuos en la muestra. Este método permite una detección altamente sensible y rápida de contaminantes orgánicos en superficies o líquidos (MicroPlanet, 2016).



**Figura 10.** Reacción bioluminiscente durante la desfosforilación del ATP

**Nota.** Kepler, 2022

## **VI. Metodología**

### **A. Validación de un método de limpieza**

#### **1. Establecimiento de parámetros a evaluar:**

- a. Repetibilidad: medir la presencia de ATP como indicador de la carga orgánica en las superficies tratadas y la repetibilidad del método, tomando en cuenta la tolerancia establecida por la empresa: 300 URL.
- b. Capacidad del proceso: se establece que el CpK debe estar arriba de 1.33 para que el proceso sea validado.
- c. Puntos Críticos: Determinar las áreas de la línea de producción que son más susceptibles a la contaminación y que requieren atención especial durante el proceso de limpieza.

#### **2. Diseño de prueba experimental**

- a. Diseñar una metodología que permita la medición del nivel de URL en diferentes puntos de la línea de producción antes y después del proceso de limpieza y desinfección. Esto incluirá la toma de muestras en áreas estratégicas para obtener datos representativos. Esta se encuentra en la sección XII.G.5
- b. Es necesario repetir el proceso de limpieza al menos **tres veces** para demostrar su eficacia antes de integrarlo en la rutina, garantizando así que los equipos estén en un estado limpio (Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2016).

#### **3. Establecimiento de criterios de aceptabilidad**

- a. Definir los criterios de aceptación, estableciendo que un nivel de URL superior a 300 se considera inaceptable. Este umbral se basa en un método previamente validado por la empresa a nivel regional, asegurando la consistencia y la confianza en los resultados obtenidos.

#### **4. Desarrollo de pruebas experimentales**

- a. Implementar las pruebas experimentales siguiendo la metodología establecida. Esto implicará realizar la limpieza y desinfección en las áreas seleccionadas, seguido de la

realización de muestro de superficies para la medición de URL. Estas se encuentran en la sección XII.G.5 y VII.A

## **5. Evaluación de resultados**

- a. Analizar los datos obtenidos utilizando métodos estadísticos apropiados para determinar la eficacia del proceso de limpieza y desinfección. Comparar los niveles de URL antes y después del tratamiento, evaluando si se cumplen los criterios de aceptabilidad establecidos.
- b. Incluir lo puntos críticos del proceso

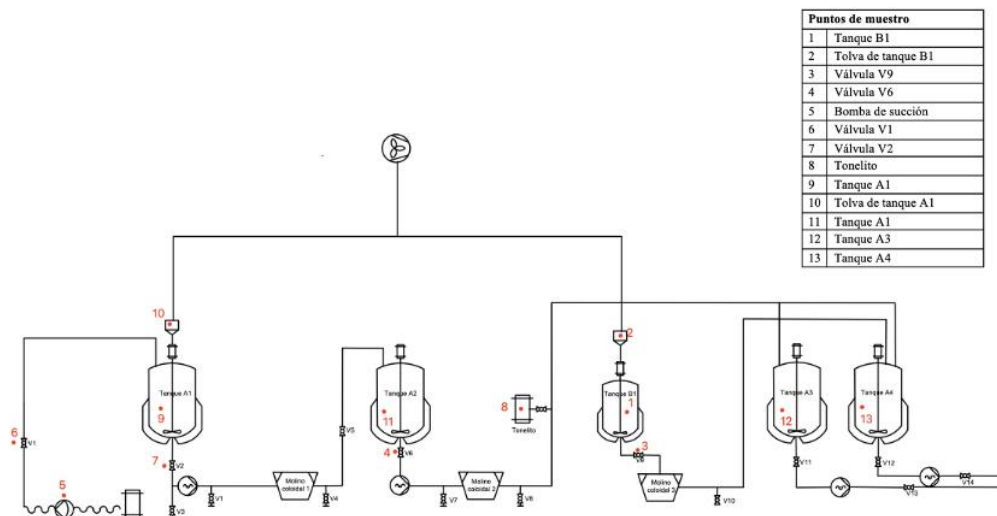
## B. Diseño de prueba experimental para validación de proceso de limpieza y desinfección de línea de producción

### 1. Materiales y equipos:

- MVP ICON®, luminómetro para detección de residuos orgánicos
- Hisopos (MVP ICON Surface Sampling Device)

### 2. Procedimiento:

- a. **Selección de puntos de muestreo:** Selección de puntos representativos que abarquen diferentes áreas y equipos.



**Figura 11.** Representación gráfica de los puntos de muestreo.

**Nota.** Imagen propia

### b. Muestreo antes del proceso de limpieza y desinfección:

- Antes de realizar la limpieza y desinfección, realizar muestreo de las superficies seleccionadas utilizando hisopos estériles.
- Tomar el hisopo para análisis de superficies
- Quitar tapadera de hisopo
- Raspar la superficie con el hisopo en un área de 10X10 cm en los puntos críticos.
- Colocar nuevamente la tapadera del hisopo
- Activar el hisopo, ejerciendo presión en la parte superior del hisopo.

- vii. Insertar el hisopo activado en el equipo de medición
- viii. Seleccionar prueba rápida en el programa
- ix. Revisar resultado en URL y anotar en protocolo de control de limpieza
- c. Proceso de limpieza y desinfección en línea de formulación:**
  - i. Descrito en la sección D. de metodologías
- d. Proceso limpieza y desinfección en línea de envasado:**
  - ii. Descrito en la sección D. de metodologías
- e. Muestreo después del proceso de limpieza:**
  - iii. Realizar muestreo de URL en los mismos puntos previamente seleccionados.
- f. Replicación del proceso para análisis estadístico de puntos críticos:**
  - iv. Realizar muestreo completo 3 veces
- g. Análisis de datos**

## **C. Proceso de limpieza y desinfección de línea de formulación**

### **1. Materiales para línea de formulación:**

- Detergente al 3 % (v/v) % (0.03 cc por cada litro de agua). Se utilizará un total de 600 L.
- Desinfectante al 0.2 % (v/v) % (0.2 cc por cada 100 litros de agua). Se utilizará un total de 300 L.

### **2. Procedimiento de limpieza y desinfección de línea de formulación:**

**a. Enjuague con agua:** Antes de iniciar el proceso de limpieza, se debe realizar un barrido con agua en todo el proceso de formulación.

**b. Limpieza de detergente:**

- i. Preparar en un tonel previamente limpio la solución de detergente al 3 % (0.03 cc de detergente por cada litro de agua). Se utilizará un volumen de 300 L.
- ii. Utilizando la bomba de succión en el primer piso de la planta, succionar del tonel la cantidad de solución preparada y bombearla al tanque 1.
- iii. Recircular la solución en el tanque 1 por 15 min.
- iv. Transferir al tanque 2 la solución recirculada y realizar las operaciones de recirculación por 15 min.

**c. Acción mecánica:**

- i. Transferir hacia los molinos 1 y 2 la solución para limpieza interna de los molinos. Encender los molinos y transferir la solución en partes iguales hacia los tanques 3 y 4 y drenar.
- ii. Preparar 300 L adicionales de solución al 3% de detergente y lavar las paredes de los tanques 3 y 4. Usar parte de esta solución (100 L) para lavar distribuidor de líneas y bomba de recirculación. La solución se drena en IBCs.
- iii. Utilizar el resto de solución al 3 % de detergente para lavar las paredes del tanque B1.
- iv. Trasladar al molino 3 y dejar actuar por 15 minutos.
- v. Drenar todo el sistema. Después de 10 min de dejar actuar la solución al interior de las tuberías hacia las líneas de empaque.

**d. Enjuague con agua:**

- i. Con una manguera con agua o hidrolavadora, retire toda la suciedad y el exceso de detergente de la superficie de los tanques con agua, usando los mismos pasos anteriores para cada tanque y equipos (incluido el desespumador).

**e. Desinfección:**

- i. Preparar 300 L de solución de desinfectante.
- ii. Dejar correr la solución preparada por el sistema (tanque A1, A2 A3 y A4 y molinos 1, 2 y 3)
- iii. Preparar 100 L adicionales de solución de desinfectante ES al 0.2 %. Luego, lavar con esta las paredes del tanque B1 y drenar todo el sistema. No es necesario enjuagar con agua luego de utilizar el desinfectante.

## **D. Limpieza y desinfección de llenadoras de líneas de envasado**

### **1. Materiales:**

- Detergente al 3% (0.03 cc de detergente por cada litro de agua)
- Solución de desinfectante ES al 0,06 % V/V (0,6 mililitros de desinfectante puro por cada litro de agua)
- Equipo de protección personal.

### **2. Procedimiento para limpieza y desinfección de envasadora:**

- Instalación de mangueras y tubos:** Para comenzar el proceso de limpieza, instalar las mangueras de lavado y los tubos de los cilindros.
- Enjuague con agua:** a) Humedecer las superficies a lavar, como tuberías, depósitos, cilindros, mangueras y boquillas, con agua. Distribuir 100 L de agua en todos los equipos.
- Limpieza con detergente:**
  - Preparar 200 L de la solución detergente al 3 % (0.03 cc de detergente por cada litro de agua) en un IBC o tonel previamente limpio.
  - Utilizar la bomba de succión para succionar del IBC o tonel toda la solución preparada y bombearla por todo el proceso.
  - Drenar alrededor de la mitad de la solución. Luego abrir el depósito superior y lavar sus paredes manualmente con una esponja o trapo limpio.
  - Drenar el resto de la solución.
  - Enjuagar con agua todo el sistema para eliminar el resto de solución. (Se debe utilizar la misma cantidad de agua que de la solución).
- Desinfección con desinfectante:**
  - Preparar en un IBC o tonel previamente limpio 200 L de solución de desinfectante al 0,06 % V/V (0,6 mililitros de desinfectante ES puro por cada litro de agua). A continuación, se detalla la cantidad de agua y desinfectante que se utilizará para cada línea de envasado:
  - Utilizar la bomba para succionar del IBC toda la solución preparada y bombearla al depósito superior (caja).
  - Drenar alrededor de la mitad de la solución. Luego abrir el depósito superior y lavar sus paredes manualmente con una esponja o trapo limpio. Nota: Utilizar guantes.
  - Drenar el resto de la solución.

## **E. Determinación de fuentes de contaminación microbiológica en materias primas**

### **1. Materiales y equipos**

- Agar Plate Count para conteo aeróbico total.
- Agua peptonada.
- Ingrediente activo
- Agua utilizada en el proceso de producción
- Dispersante 1
- Dispersante 2
- Dispersante 3
- Dispersante 4
- Dispersante 5
- Colorante
- Espesante (goma chantan)
- Adhesivo
- Antiespumante
- 50 placas Petri de plástico esterilizadas
- 10 puntas de micropipeta pipeta estériles
- Micropipeta de 1000 microlitros
- Incubadoras a las temperaturas adecuadas para el crecimiento de microorganismos.
- Autoclave
- Láminas de inmersión marca Merck

### **2. Procedimiento**

#### **a. Muestreo de materia prima para evaluación de contaminación microbiológica**

- i. Recolectar muestras de agua utilizada en el proceso de producción en puntos representativos.
- ii. Almacenar las muestras en recipientes estériles.
- iii. Asegurarse de analizar el agua en un antes de que pasen 24 horas luego de la toma de muestra.

#### **b. Preparación de agua peptonada como disolvente**

- i. Preparar tubos de ensayo ml de ensayo con 90 ml agua peptonada. Se preparan 1 por cada materia prima y 6 por muestra de agua.
  - ii. Autoclavear todos los tubos con agua peptonada por una hora a 121 °C
- c. Preparación de medio de cultivo:**
- i. Agregar 11.6 g en un Erlenmeyer de 500 mL y agregar 500 mL de agua
  - ii. Calentar y agitar hasta que el agar se disuelva
  - iii. Autoclavear medio de cultivo a 121 °C por 1 hora
  - iv. Después de la autoclave, enfría el agar a aproximadamente 50-55 °C.
  - v. Agregar 20 mL de agar en cada una de las placas de ensayo
- Nota: Se debe trabajar bajo la campana de flujo laminar previamente desinfectada.
- d. Diluciones seriadas:**
- i. Para de agua se realizan 6 diluciones seriadas de 1 mL en los tubos de agua peptona preparada anteriormente.
  - ii. Para el resto de las materias primas se realizan 2 diluciones solamente de 1 ml.
  - iii. Para las materias primas sólidas se agrega 1g en el primer tubo de ensayo
  - iv. Se agita el tubo de ensayo hasta que la muestra quede homogénea
  - v. Se realiza la dilución correspondiente.
- e. Siembra de materia prima en medios de cultivo**
- i. Sembrar alícuotas de 1 ml de las diluciones en placas con agar PCA
  - ii. Incubar las placas en condiciones aeróbicas a una temperatura de 30 °C por 3 días.
- f. Recuento y registro de colonias**
- i. Realizar el recuento de colonias.
  - ii. Registrar los resultados en UFC/ml o UFC/g según corresponda.

## **F. Evaluación de contaminación en fungicida antes y después de la implementación de medidas para la prevención de contaminación microbiológica.**

### **1. Materiales y equipos:**

- Muestra de fungicida de lote producido antes de la implementación de mejoras para la prevención de contaminación microbiológica
- Muestra de fungicida de lote producido después de la implementación de mejoras para la prevención de contaminación microbiológica
- Agar Plate Count para conteo aeróbico total.
- Agua peptonada.
- Micropipeta de 1000 microlitros
- 6 puntas de pipeta
- 36 cajas Petri
- Incubadoras a las temperaturas adecuadas para el crecimiento de microorganismos.
- Autoclave

### **2. Procedimiento:**

#### **a. Preparación de agua peptonada como disolvente**

- i. Preparar tubos de ensayo ml de ensayo con 90 ml agua peptonada. Se preparan 6 por cada muestra.
- ii. Autoclavear todos los tubos con agua peptonada por una hora a 121 °C
- iii. Realizar 3 diluciones seriadas con cada una de las muestras a analizar

#### **b. Preparación de medio de cultivo:**

- i. Agregar 11.6 g en un Erlenmeyer de 500 mL y agregar 500 mL de agua
  - ii. Calentar y agitar hasta que el agar se disuelva
  - iii. Autoclavear medio de cultivo a 121 °C por 1 hora
  - iv. Después de la autoclave, enfría el agar a aproximadamente 50-55 °C.
  - v. Agregar 20 mL de agar en cada una de las placas de ensayo
- Nota: Se debe trabajar bajo la campana de flujo laminar previamente desinfectada.

#### **c. Diluciones seriadas:**

- i. Se realizan 6 diluciones seriadas de 1 mL por cada muestra en los tubos de agua peptona preparada anteriormente.

#### **d. Siembra de materia prima en medios de cultivo**

- i. Sembrar por vertido alícuotas de 1 ml de las diluciones en placas con agar PCA
  - ii. Incubar las placas en condiciones aeróbicas a una temperatura de 30 °C por 3 días.
- e. Recuento y registro de colonias**
- i. Realizar el recuento de colonias.
  - ii. Registrar los resultados en UFC/ml o UFC/g según corresponda.

## VII. Resultados

### A. Evaluación de las fuentes de contaminación microbiológica

**Cuadro 1.** Formulación de fungicida y recuento total aeróbico por cada cada materia prima

Compuesto	Porcentaje m/m	Recuento total aeróbico promedio (UFC/mL)	Cumple o no cumple
Ingrediente activo	43.177	<10	CUMPLE
Agua	40.113	13 000 ± 650	NO CUMPLE
Dispersante 1	1.7602	<10	CUMPLE
Dispersante 2	2.92	<10	CUMPLE
Dispersante 3	1.67	<10	CUMPLE
Dispersante 4	0.833	<10	CUMPLE
Dispersante 5	0.417	<10	CUMPLE
Colorante	0.04	<10	CUMPLE
Espesante (goma chantan)	0.200	<10	CUMPLE
Adhesivo	3.33	<10	CUMPLE
Antiespumante	0.167	<10	CUMPLE

Los porcentajes m/m se obtuvo directamente del procedimiento de formulación del fungicida estudiado. Por otro lado, se observa el recuento total aeróbico promedio de la materia prima, extraído de los datos se encuentran en el Cuadro 14, en la sección XII.A de Apéndice. Los datos se obtuvieron por medio del método M66: USP 43 NF 38 Farmacopea de los Estados Unidos.

**Cuadro 2.** Análisis de cloro total y recuento total aeróbico de agua industrial en diferentes puntos de muestreo

Ubicación toma de muestra	Tipo de análisis					
	Cloro total (ppm) ±0.1 ppm			Recuento total aeróbico		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
<b>Cisterna</b>	1.5	1.3	1.5	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Agua sin tratamiento de intercambio iónico</b>	1.4	1.3	1.5	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Tanque de almacenamiento de agua tratada</b>	0	0	0	Alto	Medio	Alto

La cantidad de cloro total en las muestras se obtuvo mediante el método de Spectroquant. Por otro lado, el recuento total aeróbico se determinó utilizando láminas de inmersión C149015 marca Merck, los datos del recuento total aeróbico se obtuvo a partir del Cuadro 17, en la sección XII.D del Apéndice.

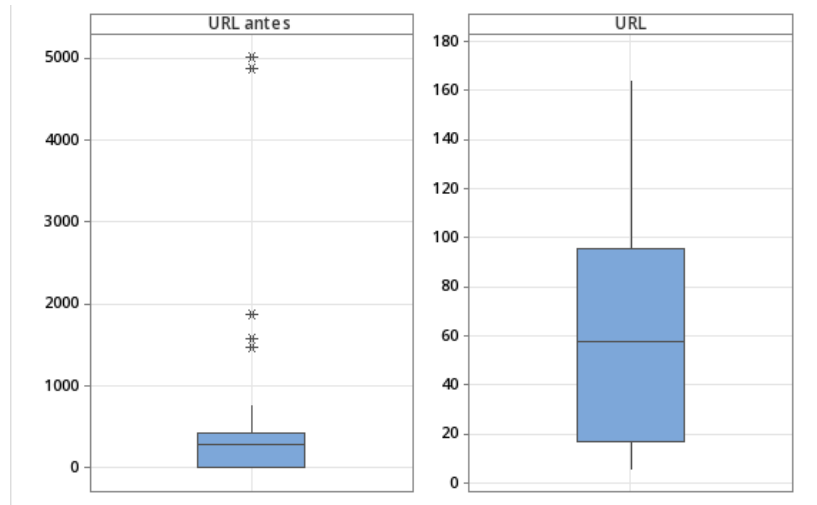
## B. Validación de método de limpieza y desinfección de la línea de formulación y envasado de fungicida

### 1. Análisis estadístico de mediciones de URL en línea de formulación

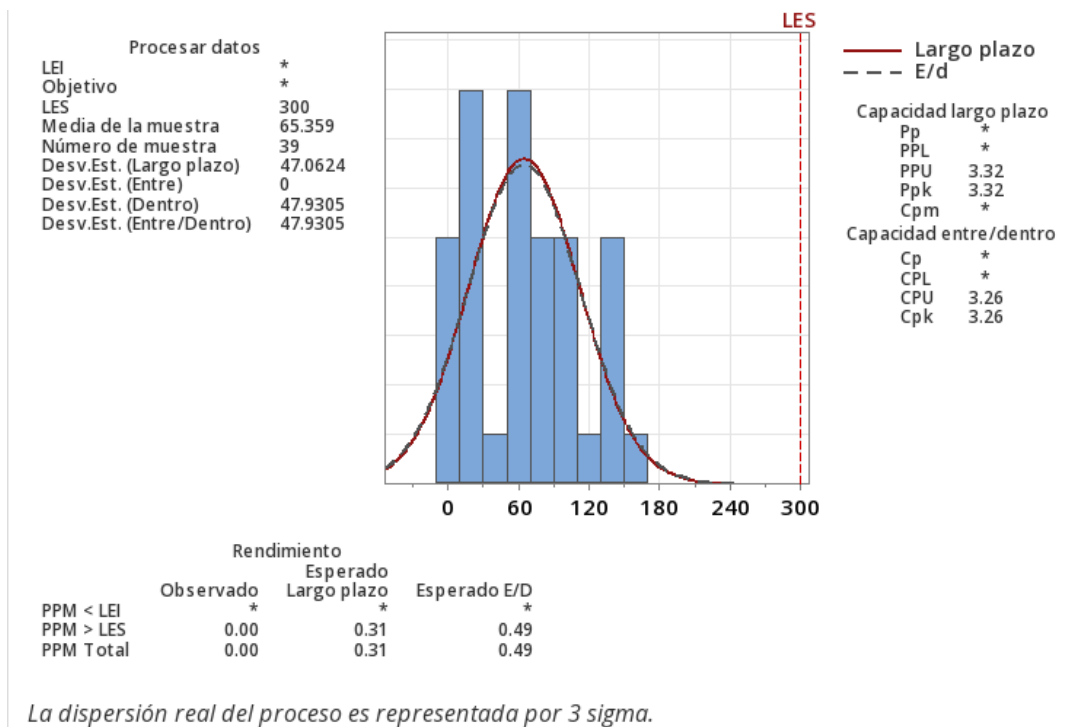
**Cuadro 3.** Puntos que cumplen con el de unidades relativas de luz antes y después del proceso de limpieza y desinfección en línea de formulación

	Muestreo	Cantidad de puntos muestreados	Cantidad de puntos que cumplen	Puntos que cumplen	Promedio	Desviación estándar	Intervalo de confianza
<b>Antes de proceso de limpieza y desinfección</b>	1	13	6	46.15 %	51.28%	4.44%	[46.14%; 53.85%]
	2		7	53.85 %			
	3		7	53.85 %			
<b>Después de proceso de limpieza y desinfección</b>	1	13	13	100.00 %	100%	0.00%	[100% ; 100%]
	2		13	100.00 %			
	3		13	100.00 %			

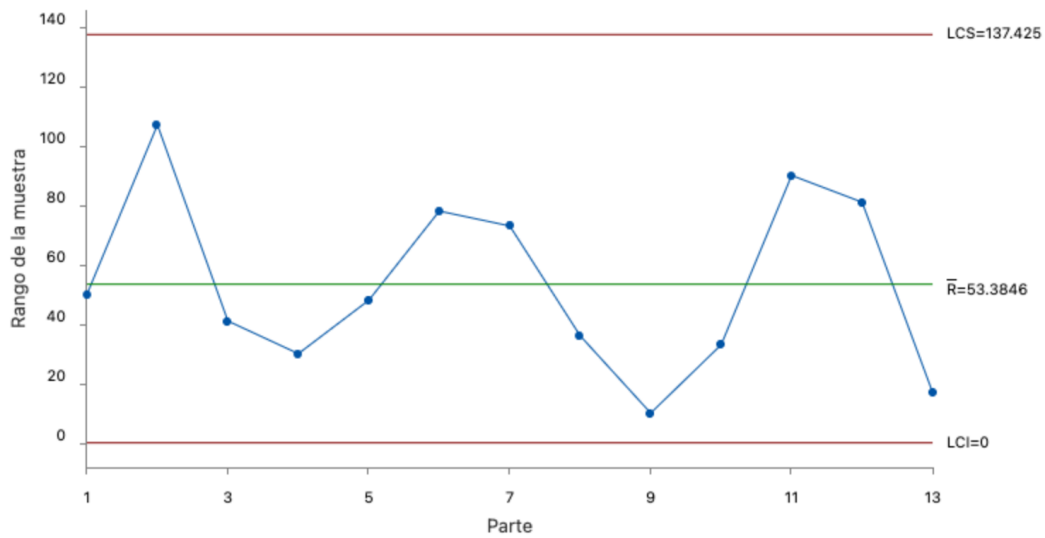
Los resultados se obtuvieron a partir de los datos del Cuadro 15, en la sección XII.A de apéndice, en la página 15. El límite de unidades relativas de luz es de 300; los puntos que sobrepasan este límite no cumplen con los estándares establecidos.



**Figura 12.** Análisis de datos, gráfica de caja antes y después de proceso de limpieza y desinfección.  
**Nota.** La gráfica se generó en “Minitap-Software Estadístico”. Se observa una mayor dispersión en los datos antes de la implementación del proceso de limpieza.



**Figura 13.** Informe de capacidad de proceso de limpieza y desinfección en línea de formulación.  
**Nota.** La gráfica y el análisis se generaron en "Minitap-Software Estadístico". El cpK se encuentra arriba del del mínimo aceptable, que es de 1.33.



**Figura 14.** Gráfica de repetibilidad de mediciones de URL en línea de formulación después de la implementación del proceso de limpieza.

**Nota.** La gráfica se generó en "Minitap- Software Estadístico". Las mediciones se encuentran debajo del límite superior (300URL), por lo que el proceso es repetible.

## 2. Definición de puntos críticos en línea de formulación

**Cuadro 4.** Definición de puntos críticos en formulación según el promedio de URL

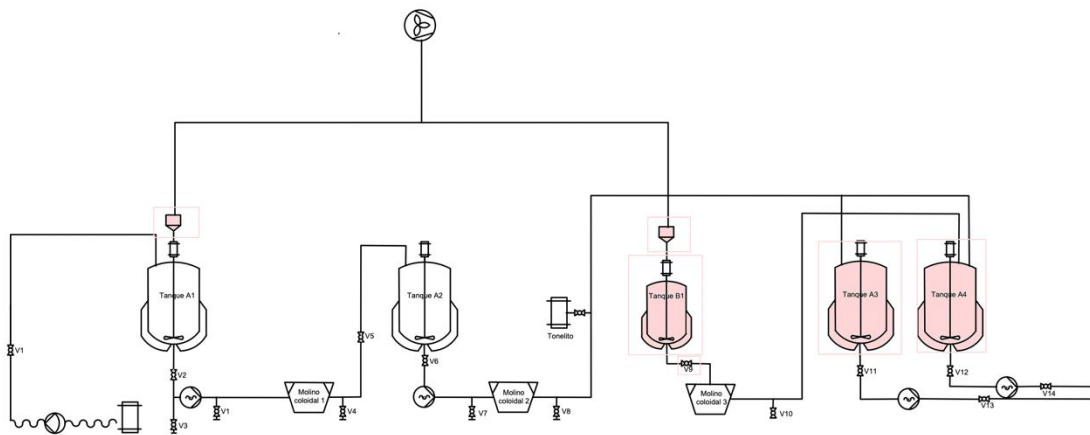
Lugar	Promedio URL	Cumple o no cumple	Definición de posibles puntos críticos
Tanque B1	1958.33	NO CUMPLE	
Tolva de tanque B1	421.33	NO CUMPLE	
Válvula V9	2813.33	NO CUMPLE	
Válvula V6	377.67	NO CUMPLE	
Bomba de succión	173.00	CUMPLE	
Válvula V1	51.67	CUMPLE	
Válvula V2	341.33	NO CUMPLE	
Tonelito	285.00	CUMPLE	
Tanque A1	28.33	CUMPLE	
Tolva de tanque A1	882.67	NO CUMPLE	
Tanque A1	13.00	CUMPLE	
Tanque A3	20.33	CUMPLE	
Tanque A4	11.33	CUMPLE	

El promedio de las unidades relativas de luz se obtuvo a partir de los datos expuestos en el Cuadro 15, en la sección XII.A de Apéndice. Todos aquellos puntos que, en promedio, no cumplen con el límite de URL, son definidos como posibles puntos críticos.

**Cuadro 5.** Definición de puntos críticos en línea de formulación y criterios de su selección

Punto crítico	Criterio de selección
Tolva de descarga de tanque B1	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Alta exposición al ambiente, lo que aumenta la probabilidad de contaminación microbológica.</li> <li>○ En este punto se añade goma xantana sólida, lo que favorece la acumulación de residuos en las superficies.</li> <li>○ Los resultados del análisis de URL indican que el promedio está por encima del límite permitido, lo cual sugiere una potencial acumulación de residuos.</li> </ul>
Tolva de descarga de tanque A1	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Alta exposición al ambiente, lo que aumenta la probabilidad de contaminación microbológica.</li> <li>○ En esta área se añaden sólidos, lo que presenta un riesgo de acumulación de residuos.</li> <li>○ Los promedios de URL son mayores al límite permitido, confirmando su clasificación como punto crítico.</li> </ul>

Tanque B1	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Se prepara la goma xantana, lo que aumenta el riesgo de residuos en las superficies internas del tanque. La goma xantana es un material viscoso y compuesto de materia orgánica que puede ser difícil de eliminar completamente, lo que representa un riesgo de contaminación microbiológica si no se limpian adecuadamente las superficies.</li> <li>○ Los promedios de URL son mayores al límite permitido, confirmando su clasificación como punto crítico.</li> </ul>
Válvula B9 (salida de Tanque B1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Está conectada a la salida del tanque B1, por lo que hay posibilidad de acumulación de residuos de goma xantana.</li> <li>○ Los promedios de URL son mayores al límite permitido, confirmando su clasificación como punto crítico.</li> </ul>
Tanque A3 y A4	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ El producto preparado en estos reactores contiene goma Xantana</li> <li>○ Es la última operación unitaria del proceso</li> </ul>



**Figura 15.** Representación gráfica de puntos críticos en línea de producción

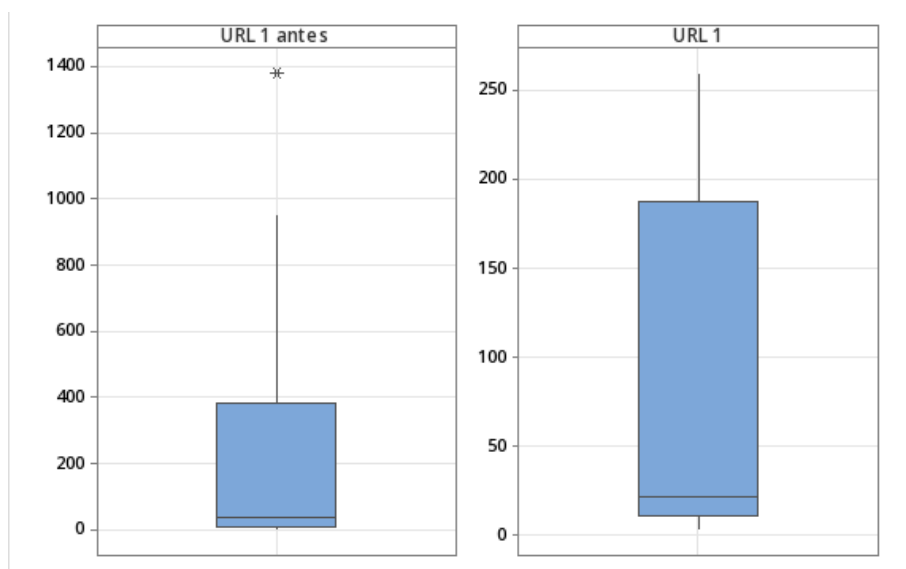
**Nota.** Tolva de descarga de tanque A1, tolva de descarga de tanque B1, tanque B1 y válvula V9

### 3. Análisis estadístico de mediciones de URL en envasadora

**Cuadro 6.** Puntos que cumplen con el de unidades relativas de luz antes y después del proceso de limpieza y desinfección en envasadora

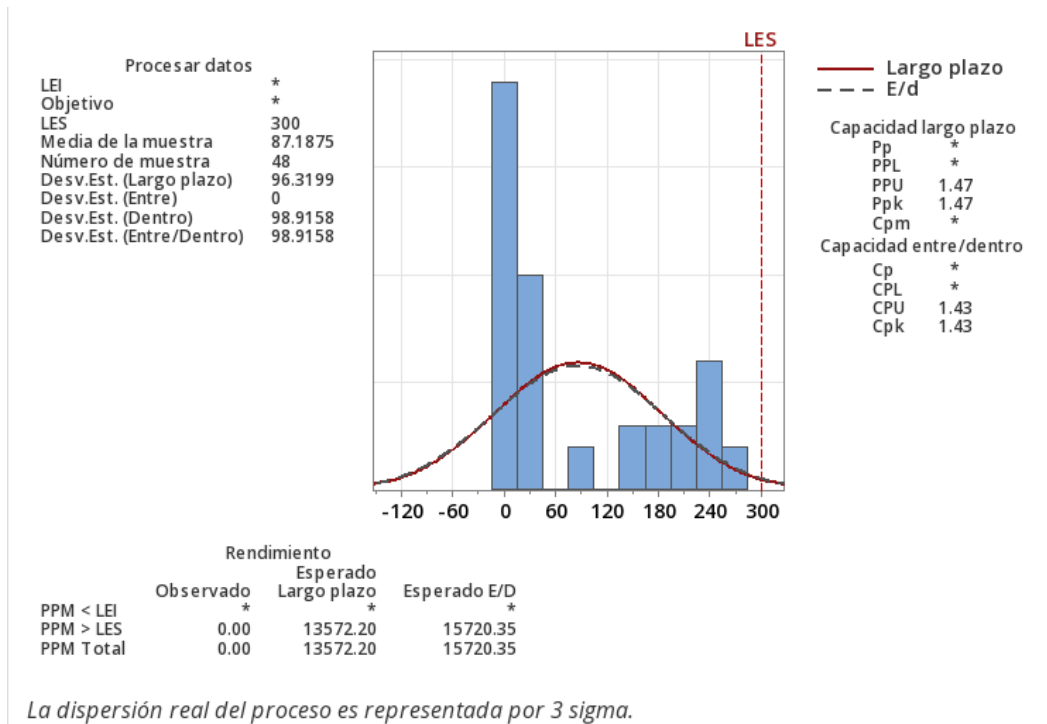
	Muestreo	Cantidad de puntos muestreados	Cantidad de puntos que cumplen	Puntos que cumplen	Promedio	Desviación estándar	Intervalo de confianza
Antes de proceso de limpieza y desinfección	1	16	10	62.50 %	68.75%	4.44%	[62.50%; 81.25%]
	2		10	62.50 %			
	3		13	81.25 %			
Después de proceso de limpieza y desinfección	1	16	16	100.00 %	100.00%	0.00%	[100%; 100%]
	2		16	100.00 %			
	3		16	100.00 %			

Los resultados se obtuvieron a partir de los datos del Cuadro 16, en la sección XII.D de apéndice. El límite de unidades relativas de luz es de 300; los puntos que sobrepasan este límite no cumplen con los estándares establecidos.



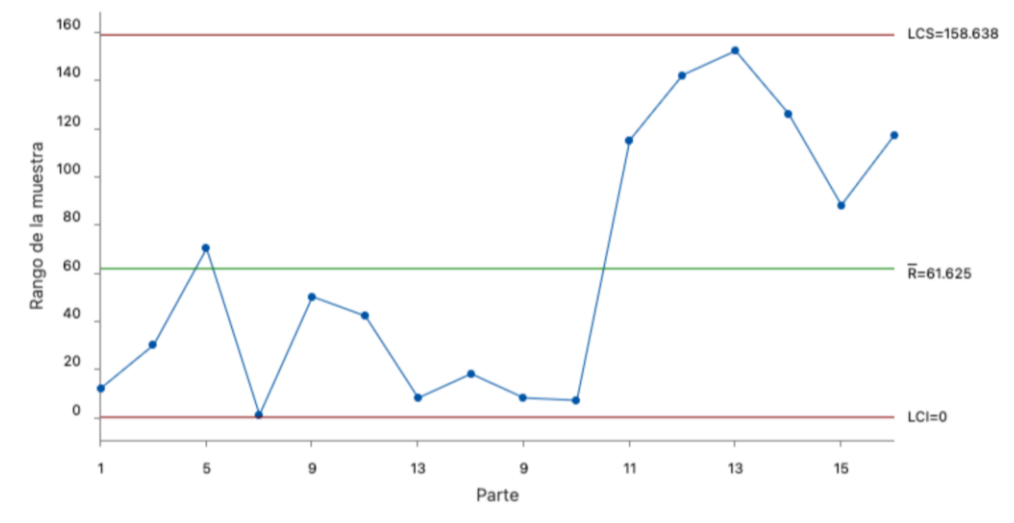
**Figura 16.** Gráfica de caja antes y después de proceso de limpieza y desinfección en envasadora.

**Nota.** La gráfica se generó en “Minitap-Software Estadístico”. Se observa una mayor dispersión en los datos antes de la implementación del proceso de limpieza.



**Figura 17.** Informe de capacidad de proceso de limpieza y desinfección en envasadora

**Nota.** La gráfica y el análisis se generaron en "Minitap-Software Estadístico". El cpK se encuentra arriba del del mínimo aceptable, que es de 1.33.



**Figura 18.** Gráfica de repetibilidad de mediciones de URL en envasadora

**Nota.** La gráfica se generó en "Minitap- Software Estadístico". Las mediciones se encuentran debajo del límite superior (300URL), por lo que el proceso es repetible

#### 4. Definición de puntos críticos en línea de formulación

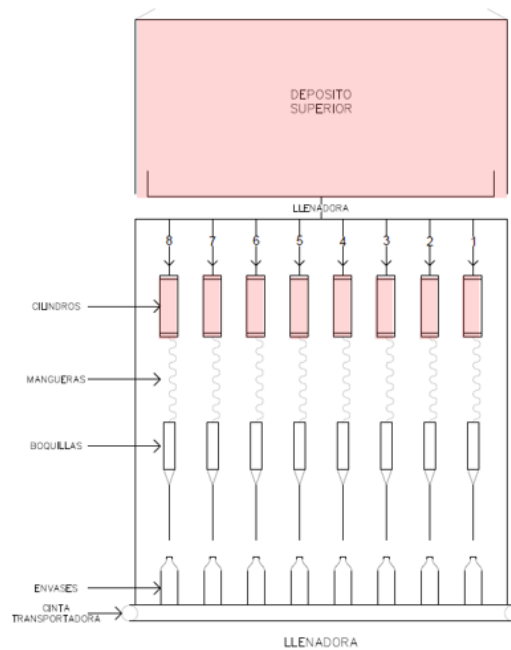
**Cuadro 7.** Definición de puntos críticos según el promedio de URL en envasadora

Lugar	Promedio URL	Cumple o no cumple	Definición de posibles puntos calientes
Boquilla 1	23.000	CUMPLE	
Boquilla 3	14.333	CUMPLE	
Boquilla 5	17.667	CUMPLE	
Boquilla 7	13.667	CUMPLE	
Depósito superior	366.333	NO CUMPLE	
Depósito superior	758.000	NO CUMPLE	
Manguera 2	9.667	CUMPLE	
Manguera 4	11.667	CUMPLE	
Manguera 6	8.667	CUMPLE	
Manguera 8	7.333	CUMPLE	
Cilindro 1	563.000	NO CUMPLE	
Cilindro 3	376.667	NO CUMPLE	
Cilindro 5	686.667	NO CUMPLE	
Cilindro 8	349.667	NO CUMPLE	
Tubería 1	41.667	CUMPLE	
Tubería 2	84.000	CUMPLE	

El promedio de las unidades relativas de luz se obtuvo a partir de los datos expuestos en Cuadro 16, en la sección XII.A del Apéndice. Todos aquellos puntos que, en promedio, no cumplen con el límite de URL, son definidos posibles puntos críticos.

**Cuadro 8.** Definición de puntos críticos en envasadora y criterios de su selección

Punto crítico	Criterio de selección
Depósito superior	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Alta exposición al ambiente, lo que aumenta la probabilidad de contaminación microbiológica.</li> <li>○ Los resultados del análisis de URL indican que el promedio está por encima del límite permitido.</li> </ul>
Cilindros	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Contacto directo con el producto durante el envasado.</li> <li>○ Los resultados del análisis de URL indican que el promedio está por encima del límite permitido</li> </ul>



**Figura 19.** Representación gráfica de puntos críticos en envasadora

## C. Análisis microbiológico del producto

**Cuadro 9.** Análisis microbiológico de producto semiterminado

No. Muestreo	Antes de la implementación de medidas preventivas		Después de la implementación de medidas preventivas	
	Recuento total aeróbico (UFC/mL)	Cumple o no cumple	Recuento total aeróbico (UFC/mL)	Cumple o no cumple
1	6.77E+05 ± 33 500	NO CUMPLE	<10	CUMPLE
2	8.00E+05 ± 40 124.6	NO CUMPLE	<10	CUMPLE
3	6.67E+05 ± 33 333.3	NO CUMPLE	<10	CUMPLE

Los resultados expuestos se obtuvieron del Cuadro 18, en la sección XII.D de Apéndice. Las muestras que presentan contaminación no cumplen con los estándares requeridos. Los datos se obtuvieron por medio del método M66: USP 43 NF 38 Farmacopea de los Estados Unidos.

**Cuadro 10.** Análisis microbiológico de producto terminado

No. Muestreo	Antes de la implementación de medidas preventivas		Después de la implementación de medidas preventivas	
	Recuento total aeróbico (UFC/mL)	Cumple o no cumple	Recuento total aeróbico (UFC/mL)	Cumple o no cumple
1	1.40E+06 ± 70 000.7	NO CUMPLE	<10	CUMPLE
2	1.13E+06 ± 56 500.6	NO CUMPLE	<10	CUMPLE
3	7.33E+05 ± 36 664.4	NO CUMPLE	<10	CUMPLE

Los resultados expuestos se obtuvieron del Cuadro 19, en la sección XII.D de Apéndice. Las muestras que presentan contaminación no cumplen con los estándares requeridos. Los datos se obtuvieron por medio del método M66: USP 43 NF 38 Farmacopea de los Estados Unidos.

## D. Medidas implementadas para la prevención de contaminación microbiológica

**Cuadro 11.** Medidas implementadas para la prevención de contaminación microbiológica

<b>Medida implementada</b>	<b>Descripción</b>
Dosificación de hipoclorito de sodio	Se implementó la dosificación de hipoclorito de sodio a 1.5 ppm en el agua almacenada en el tanque de almacenamiento, luego de su tratamiento de deionización.
Limpieza y desinfección de línea de formulación y envasado	Se implementó la limpieza 0.03 cc de detergente por cada litro de agua y la desinfección con 0,6 mililitros de desinfectante puro por cada litro de agua.
Análisis de agua	Se implementó muestreo y análisis microbiológico de agua con el método de láminas de inmersión, para llevar control de la inocuidad de esta.

## **E. Protocolo para la prevención y control de contaminación microbiológica en proceso de producción de fungicida**

### **1. Propósito**

Prevenir la contaminación microbiológica en las instalaciones es fundamental para garantizar la fabricación de productos de alta calidad y seguridad. Esto se logra mediante la limpieza regular, la realización de evaluaciones de efectividad y análisis microbiológicos y fisicoquímicos del agua y los productos semiterminados. Estas acciones tienen como objetivo mantener un ambiente de producción libre de microorganismos y asegurar que los productos cumplan con los estándares de calidad. De esta manera, se asegura el cumplimiento de las normativas y regulaciones relacionadas con la prevención de la contaminación microbiológica en la planta.

### **2. Alcance**

El alcance del proceso de operación estándar se centra en la prevención de la contaminación microbiológica de un fungicida de suspensión concentradas en una planta de productora de productos químicos a través de la implementación de medidas de limpieza, su evaluación y análisis microbiológicos de materia prima y producto semiterminado y terminado.

### 3. Términos y definiciones

<b>Término</b>	<b>Definición</b>
<b>URL</b>	Medida utilizada para cuantificar la intensidad de luz en comparación con un valor de referencia estándar. Se emplea en fotometría para describir la cantidad de luz emitida o reflejada en un entorno determinado.
<b>UFC (Unidades Formadoras de Colonias)</b>	Unidad empleada en microbiología para estimar el número de microorganismos viables en una muestra. Cada unidad representa una colonia visible que se forma cuando un microorganismo se reproduce en condiciones adecuadas, indicando la presencia y concentración de microorganismos vivos en la muestra.
<b>Limpieza</b>	Proceso que utiliza detergentes, compuestos químicos que facilitan la disolución de grasa y suciedad, lo que permite su eliminación. Los detergentes, ya sean sintéticos o naturales, se emplean en diferentes contextos, desde la limpieza del hogar hasta la desinfección en entornos industriales y de atención médica.
<b>Desinfección</b>	Proceso que consiste en eliminar o reducir microorganismos patógenos en superficies, objetos o líquidos, utilizando desinfectantes que pueden ser químicos, térmicos o físicos. Este procedimiento es esencial para prevenir infecciones en hospitales, industrias alimentarias y hogares, y generalmente sigue a la limpieza para asegurar una eliminación efectiva de gérmenes.
<b>Lámina de inmersión</b>	Método microbiológico que emplea placas de Petri o láminas especiales para sumergir muestras líquidas y permitir el crecimiento de microorganismos aeróbicos en un medio de cultivo. Esta técnica es útil para determinar la calidad microbiológica de agua o alimentos, permitiendo contar la cantidad total de bacterias presentes en la muestra.
<b>Biocida</b>	Compuesto que puede eliminar o inhibir el crecimiento de organismos vivos como bacterias, hongos, virus y parásitos. Los biocidas se utilizan en diversas aplicaciones, que incluyen la desinfección, conservación de productos, tratamiento de aguas y control de plagas. Estos se clasifican en diferentes tipos, como desinfectantes, pesticidas y fungicidas, según su finalidad específica.

#### 4. Roles y responsabilidades

- El **Sitio de producción** debe seguir este procedimiento para llevar a cabo una evaluación de riesgos documentada del lugar y de los sistemas, con el fin de desarrollar un programa de prevención de contaminación microbiana específico para el sitio. Además, debe garantizar la disponibilidad de recursos necesarios para llevar a cabo actividades que prevengan la contaminación microbiana.
- El **Área de Tecnología de Formulación (FT)** es responsable del desarrollo de las formulaciones. En el contexto de este procedimiento, esto implica asegurar que los productos diseñados sean resistentes a la contaminación microbiana.
- El **Departamento de calidad** en el sitio tiene la responsabilidad de asegurar que el personal esté capacitado para ayudar en la evaluación de sus sistemas y riesgos de acuerdo con este procedimiento, así como para garantizar que se implementen las acciones necesarias para prevenir la contaminación microbiana. Se sugiere designar una persona de contacto en el sitio para asuntos relacionados con la prevención de la contaminación.
- El **Área de Seguridad, Salud, Medio Ambiente y Emergencias (SSHE)** del sitio debe participar en la evaluación de riesgos y llevar a cabo las pruebas de acuerdo con esta guía y los métodos apropiados, en función del nivel de riesgo.
- El **Equipo de Calidad Regional** es responsable de asegurar la formación y la aplicación de este procedimiento, así como de respaldar la implementación general cuando sea necesario.
- **La Calidad Global** tiene la tarea de proporcionar un documento de gobernanza que establezca un enfoque armonizado a nivel global para la prevención de contaminación microbiana. También apoya los proyectos y la implementación según se requiera.
- El **Área de Estrategia y Gobierno de Formulación (FSyG)** se encarga de la gobernanza de la red de Formulación, Llenado y Envasado (FFP), entre otras cosas. Dirige y apoya la implementación de procesos relacionados con FFP y asegura que los requisitos de suministro de productos estén alineados con la tecnología de formulación. En este papel, ayuda a los sitios en la prevención de contaminación microbiana y puede ofrecer formación actualizada.
- El **organismo regulador** tiene la responsabilidad de proporcionar orientación normativa que respalde la licencia de la empresa para operar en relación con todos los aspectos de la contaminación microbiana, incluyendo la irradiación y el reprocesamiento debido a dicha contaminación.

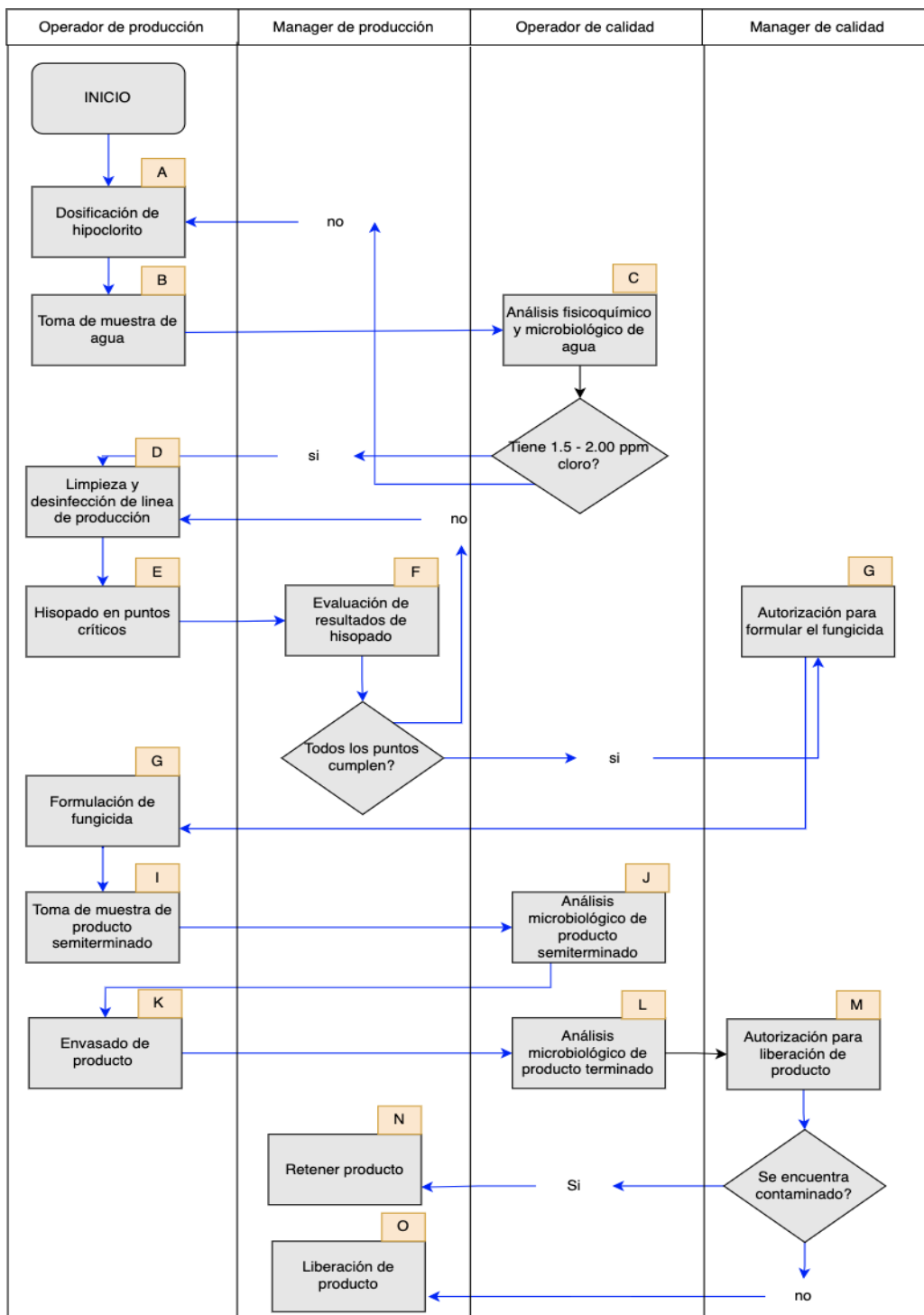
## 5. RACI

**Cuadro 12.** Responsables de actividades del proceso de prevención de contaminación microbiológica

	El sitio de producción	El sitio de calidad	El sitio de calidad regional	El sitio de calidad global	Tecnología de formulación global
Desarrollo de formulaciones de biocidas	I	I	I		R,A
Garantizar que se mantenga la licencia para operar y que haya aprobaciones regulatorias disponibles para diversos biocidas	I	I	I	I	R,A
Establecer y cumplir los requisitos del producto y del proceso.	R	C	I	I	R
Diseñar/mitigar riesgos de contaminación microbiológica para producto, instalaciones y equipos	A	R	I,C		
Establecer los procedimientos del programa de limpieza y desinfección	R	R	A	I	
Realiza el proceso de limpieza y desinfección de la línea de producción	R	I			
Realiza el hisopado de superficies de equipos de línea de producción	R	A			
Escribe procedimientos para apoyar el programa de prevención microbiana del sitio.	R	R,A	I,C	I	
Determinar y realizar planes de muestreo de agua y producto	R	R,A	C	I	C
Ejecutar análisis de agua y producto establecidos en laboratorio	I	R			
Toma de decisión para la liberación de producto terminado	I	R	I	I	
Asegura que se brinde capacitación sobre este procedimiento.	R	R	C	C	

Responsable (R)	A quien se le asigna hacer el trabajo para lograr la tarea
Accountable (A)	Toma la decisión final y tiene la propiedad final de la finalización correcta y completa de la tarea
Consultado (C)	Quien debe ser consultado antes de que se tome una decisión o acción y entregue información, hay 2 vías Responsable (R) a quien se le asigna hacer el trabajo para lograr la tarea comunicación
Informado (I)	Quien debe ser informado después de que se ha tomado una decisión o acción, hay una comunicación unidireccional

## 6. Diagrama de actividades para la prevención de contaminación del producto



**Figura 20.** Diagrama de actividades para la prevención de contaminación microbológica

**Nota.** Elaboración propia

## 7. Diseño de proceso

### **Toma de muestra de agua, su análisis microbiológico y fisicoquímico**

Para garantizar que el agua que se utiliza en las facilidades no se encuentra contaminada se realizan análisis microbiológicos. Además, cuantifica la cantidad de cloro total en ppm presente en el agua para prevenir su contaminación. El monitoreo se realiza según el Programa de monitoreo de prevención de contaminación microbiológico, expuesto en la Cuadro 13, más adelante.

- Lugar de toma de muestra de agua: Tanque de almacenamiento de agua tratada y clorada. La toma de muestra se realiza según la Metodología que se encuentra en la sección XII.G.1 del apéndice.
- Análisis microbiológico a realizar: láminas de inmersión para evaluar presencia o ausencia de microorganismos en el agua. Este análisis comprueba la presencia de microorganismos viables en el agua. El estándar aceptable de contaminación es 0 UFC/ml de agua. Si se encuentra presencia de microorganismos se debe reportar al área de producción para la limpieza del tanque de almacenamiento y recirculación del agua. El análisis se realiza según la metodología XII.G.4 del apéndice.
- Análisis fisicoquímico a realizar: cuantificación de cloro total en Spectroquant. El estándar aceptable de cloro total es de 1.50 – 2.00 ppm. Si la concentración de cloro total es menor, se debe reportar al área de producción para la corrección. El análisis se realiza según la metodología en la sección XII.G.6 del apéndice.

### **Limpieza y desinfección de línea de producción**

- Establecimiento de la secuencia de adición de biocidas: No se deben agregar diferentes biocidas uno encima del otro antes de cargarlos en la formulación, ya que esto puede desactivarlos y volverlos ineficaces. Tampoco deben agregarse en secuencia, de lo contrario, este contacto se producirá en las tuberías. Los biocidas se deben agregar en diferentes pasos del proceso (p. ej., un biocida en las moliendas y el otro biocida en la preparación de goma xantana) o se deben agregar en pasos no secuenciales (p. ej., adición de un biocida, otro coformulante, luego el segundo biocida).
- Limpieza con detergente: Eliminar físicamente la suciedad, los desechos, los biofilms, el exceso de rociado, etc., del área de fabricación, el equipo o la tubería. Esto se hace mediante métodos tales como limpiar, enjuagar, restregar y raspar utilizando un detergente. Se debe tener precaución al aplicar limpieza mecánica al acero inoxidable. La limpieza se realiza según la metodología en la sección XII.G.2 del apéndice.

- Desinfección: La desinfección implica el uso de un desinfectante químico o un tensioactivo en una concentración específica y una cantidad prescrita de tiempo de contacto para garantizar un estándar de higiene microbiológicamente aceptable. Además, se debe considerar el método de contacto para el producto utilizado. La desinfección se realiza según la metodología en la sección XII.G.2 del apéndice.

### **Hisopado en puntos críticos**

#### **Puntos críticos en línea de formulación:**

- Tolva de descarga de tanque A1
- Tolva de descarga de tanque A2
- Tanque B1
- Válvula V9
- Tanques A3 y A4

#### **Puntos críticos en línea de formulación**

- Depósito superior
- Cilindros (muestrear 2)

Prueba de ATP (BioControl MVP ICON): Se determinan las Unidades relativas de luz para confirmar la inocuidad en los equipos de la línea de producción. El límite máximo permitido es de 300 URL. Se debe dejar constancia de los datos obtenidos en cada equipo en una hoja de control. En caso algún equipo salga de rango, se debe de volver a hisopar para reconfirmar el resultado. Si persiste fuera de rango, el equipo se debe de limpiar y desinfectar manualmente por segunda vez. Se realiza según la metodología XII.G.5 del apéndice.

### **Autorización para la formulación del producto**

Los datos resultantes del proceso de hisopado son revisados por el coordinador control de calidad para autorizar la formulación del producto.

### **Toma de muestra de producto semiterminado**

Se toma muestra del producto que sale del tanque 3 y tanque 4. Este producto es resultante del proceso de formulación y el que se manda posteriormente al proceso de envasado.

### **Análisis microbiológico de producto semiterminado y terminado**

Análisis microbiológico a realizar: láminas de inmersión para evaluar presencia o ausencia de microorganismos en el agua. Este análisis comprueba la presencia de microorganismos viables en el

fungicida. El estándar aceptable de contaminación es 0 UFC/ml de agua. Si se encuentra presencia de microorganismos se debe reportar al área de producción para la limpieza del tanque de almacenamiento y recirculación del agua. El análisis se realiza según la metodología XII.G.4 del apéndice.

## **8. Diseño de equipo e instalaciones**

El diseño de las instalaciones y equipos es fundamental para asegurar la calidad del producto y reducir el riesgo de contaminaciones.

### **Diseño de Instalaciones que Involucran Agua y Aire**

Es necesario garantizar lo siguiente en el diseño de las instalaciones y en el mantenimiento regular:

- Utilizar paredes y suelos que sean fáciles de limpiar.
- Evitar materiales porosos como caucho o plástico.
- Proporcionar iluminación adecuada y suficiente espacio.
- Limitar el acceso y movimiento del personal dentro de la planta.
- Definir claramente el flujo de personal, productos y residuos.
- Incluir equipos o diseños que minimicen la generación de polvo, la dispersión del producto y la formación de aerosoles.
- Implementar un sistema de eliminación directa de residuos, así como sistemas de drenaje adecuados y áreas específicas para la contención.

### **Calidad del Agua**

El agua es utilizada como ingrediente del producto, así como disolvente (95-99%) para todos los agentes de limpieza, y también para el enjuague intermedio y final del equipo. Hay que asegurarse que el agua cumpla con estándares de calidad química y microbiológica para ser efectiva en la limpieza. Mantener el pH del agua en un rango de 5 a 8.5, lo cual es generalmente adecuado para la mayoría de los detergentes y desinfectantes. Se recomienda la adición de un agente quelante para prevenir la acumulación de depósitos o incrustaciones, ya que estos agentes se combinan con el calcio y magnesio.

Para reducir la carga microbiana en el agua, se pueden implementar los siguientes tratamientos:

- Filtración a través de un filtro con tamaño de poro de 0.2 micras.
- Uso de sistemas de purificación por ultravioleta (UV).
- Aplicación de osmosis inversa.

- Adición de desinfectantes o biocidas químicos, como hipoclorito de sodio.

### **Calidad del Aire**

El aire puede ser una de las principales fuentes de contaminantes. Si los procesos de producción están ubicados en áreas abiertas o si hay etapas críticas en las que se utiliza mucho aire, es recomendable considerar tratamientos para el aire, como filtros de 0.2 micras o filtros HEPA/ULPA, cuando sea necesario.

### **Diseño de Equipos**

Es importante diseñar y examinar los equipos para garantizar una pendiente adecuada que permita el drenaje completo del agua. Las mangueras deben ser drenadas y secadas después de cada uso, y almacenadas fuera del área de producción. Es crucial realizar evaluaciones periódicas de las mangueras, tuberías y equipos para identificar posibles problemas, como grietas, picaduras o áreas muertas, que deben ser corregidas para mejorar la gestión de riesgos microbianos. En ciertos casos, puede ser útil emplear un boroscopio para obtener imágenes de estas áreas problemáticas.

### **Higiene en la Planta y del Personal**

Proporcionar capacitación sobre prácticas de higiene básica, que incluya la limpieza de manos, la vestimenta y la higiene en el procesamiento. Es vital que el personal evite reutilizar cepillos contaminados para la limpieza y no mezcle productos contaminados con productos frescos, ya que esto puede dar lugar a recuentos microbianos viables "aceptables" que, en última instancia, pueden resultar en lotes más contaminados. También es esencial que se use el equipo de protección personal adecuado al tomar muestras para el monitoreo microbiano, con el fin de evitar la introducción de contaminación en las muestras. }

## 9. Programación

**Cuadro 13:** Programación de medidas de control de contaminación microbiológica

<b>Monitoreo de contaminación microbiológica en proceso de producción de fungicida</b>				
<b>Control</b>	<b>Actividad</b>	<b>Lugar</b>	<b>Análisis</b>	<b>Frecuencia</b>
Análisis fisicoquímico y microbiológico de agua	Toma de muestra de agua utilizada en formulación	Agua después del proceso de desionización	Análisis de cloro total Láminas de inmersión	Semanal
		Agua de cisterna	Análisis de cloro	Mensual
Análisis de limpieza y desinfección en línea de formulación	Hisopado de superficies de puntos críticos en línea de formulación	Puntos críticos de línea de formulación	URL con BioControl MVP ICON	Cada vez que se formule el fungicida estudiado (mensualmente)
Análisis de limpieza y desinfección envasadora	Hisopado de superficies de puntos críticos en envasadora	Puntos críticos de envasadora	URL con BioControl MVP ICON	Cada vez que se envase el fungicida estudiado (mensualmente)
Análisis de producto semiterminado y terminado	Se realiza análisis microbiológico de productos semiterminados y terminados	Toma de muestra en tanque 3 y 4 y de producto terminado	Láminas de inmersión	Cada vez que se produzca el fungicida estudiado (mensualmente)
Monitoreo de materias primas utilizadas en fungicida (excluyendo agua)	Se realiza análisis microbiológico de dispersantes, espesante, ingrediente activo y antiespumante	Toma de muestra en almacén de materias primas	Láminas de inmersión	Bimestral

## F. Respuesta a contaminaciones microbiológicas en fungicida

- a. **Aislar el material afectado:** Aislar todo el material afectado y potencialmente afectado en el sistema informático de la empresa, marcándolo con un estado de cuarentena. Realizar una revisión exhaustiva de otros lotes producidos inmediatamente antes y después de los lotes contaminados para garantizar que no existan lotes adicionales comprometidos. Esta revisión debe incluir la verificación de registros de producción y cualquier desviación del proceso que pueda haber contribuido a la contaminación.
- b. **Higienización del sistema:** Realizar una higienización inmediata del sistema una vez que se hayan tomado las muestras. Esta limpieza debe ser exhaustiva y seguir un protocolo establecido, asegurando que todas las superficies y equipos estén debidamente desinfectados. Se deben utilizar productos aprobados y eficaces contra los microorganismos específicos identificados.
- c. **Verificación de la desinfección:** Realizar la prueba del portaobjetos de inmersión para verificar que la desinfección del sistema se haya llevado a cabo correctamente. Es esencial repetir la desinfección según sea necesario hasta que los resultados del portaobjetos cumplan con los criterios de calidad del agua. Además, es importante llevar un registro de estas pruebas y los resultados obtenidos.
- d. **Análisis de causa raíz:** Llevar a cabo un análisis de causa raíz para identificar las causas subyacentes de la contaminación microbiológica. Este análisis debe incluir la revisión de procesos, equipos, prácticas de higiene y cualquier otro factor que pueda haber contribuido a la situación. Identificar las causas permitirá implementar medidas correctivas efectivas y prevenir recurrencias.
- e. **Revalidación de medidas preventivas:** Si se determina que las medidas actuales de prevención de contaminación microbiológica no son suficientes, se debe realizar una revalidación de estas medidas. Esto puede incluir la actualización de protocolos de limpieza, cambios en las prácticas de manejo, y capacitación adicional para el personal. Asegurarse de que todas las medidas estén alineadas con las mejores prácticas y normativas vigentes.
- f. **Retención del producto:** Retener el producto contaminado para evaluar su comportamiento a lo largo del tiempo. Esto incluye monitorear la estabilidad microbiológica y fisicoquímica del producto bajo condiciones controladas. Realizar análisis periódicos para determinar si el producto presenta cambios que puedan afectar su seguridad o calidad. Esta evaluación ayudará a tomar decisiones informadas sobre el destino del producto, ya sea su reprocesamiento, destrucción o liberación, dependiendo de los resultados obtenidos.

- g. **Documentación y seguimiento:** Mantener una documentación detallada de cada uno de los pasos realizados, desde la identificación de la contaminación hasta la evaluación del producto retenido. Establecer un plan de seguimiento para revisar las acciones implementadas y su efectividad, así como para actualizar los procedimientos de control de calidad y buenas prácticas de manufactura según sea necesario.

## VIII. Discusión

Para proponer un protocolo para la prevención de contaminación microbiológica en la línea de producción de un fungicida se evaluó las fuentes de contaminación microbiológica, centrándose especialmente en el agua y en otras materias primas, con el fin de establecer medidas preventivas. Como se observa en el Cuadro 1, en la sección VII.A de resultados, se identificó que la fuente de contaminación era el agua utilizada en el proceso. Con un recuento total aeróbico promedio de  $13,000 \pm 3,605.55$  UFC/mL se estableció que esta no cumplía con los criterios microbiológicos establecidos por la empresa (menor a 10 UFC/mL es aceptable).

La contaminación en el agua representa un riesgo para la calidad microbiológica del fungicida, ya que, al ser uno de los ingredientes con mayor proporción en la formulación (40.113 % m/m), tiene el potencial de diseminar microorganismos a lo largo de todo el proceso de fabricación. Los demás ingredientes, como el ingrediente activo y los diversos dispersantes, colorantes, espesantes, adhesivos y antiespumantes, se reportan los recuentos inferiores a 10 UFC/mL, cumpliendo con los estándares microbiológicos.

Según el Cuadro 2, los resultados de los análisis microbiológicos y de cloro total en diferentes puntos de la planta, muestran que el agua utilizada en la formulación del fungicida, proveniente del tanque de almacenamiento de agua tratada, no contenía cloro (0 ppm en todas las muestras). Esto se debe a que el agua pasa por un proceso de desionización, el cual elimina iones, incluyendo los compuestos de cloro. Si bien este tratamiento es efectivo para reducir la dureza del agua y eliminar minerales, no garantiza la eliminación de microorganismos ni previene la misma, lo que explica los recuentos elevados de bacterias aeróbicas en las muestras del agua tratada. En contraste, tanto la cisterna como el agua sin tratamiento de intercambio iónico muestran niveles adecuados de cloro residual (1.5 – 2.00 ppm), lo que ayuda a mantener la ausencia de contaminación microbiana en esas etapas. Esto subraya la necesidad de la implementación medidas correctivas en el tratamiento y manejo del agua, tales como la clorificación de la misma, con el fin de prevenir la contaminación cruzada y asegurar la inocuidad del producto final.

El segundo objetivo de esta investigación se basó en validar un método de limpieza y desinfección de la línea de producción de fungicida mediante la medición de adenosina trifosfato (ATP) como indicador de contaminación de componentes orgánicos, con el fin de garantizar la inocuidad de los equipos y del producto final. Los resultados obtenidos, presentados en el Cuadro 3 y 6, exponen una visión sobre la eficacia del proceso de limpieza y desinfección.

Según estos datos, antes de aplicar el proceso de limpieza y desinfección, se observó que el porcentaje de puntos que cumplían con los estándares de Unidades relativas de luz (URL) eran, en promedio, del 51.28 % en la línea de formulación y del 68.75 % en la envasadora. Esto pues no todos los puntos muestreados cumplían con el límite de URL de 300, establecido para garantizar una limpieza y desinfección adecuada. La desviación estándar en ambos casos resultó ser de 4.44 %, lo que indica una variabilidad moderada en los niveles de contaminación entre los distintos puntos muestreados. La variabilidad observada se debe a que en algunos muestreos se encontraron más puntos fuera de rango en comparación con otros. Esto podría estar relacionado con la limpieza de distintos productos previos, ya que no siempre se procesa el mismo tipo de producto. Adicionalmente, la eficacia de la limpieza mecánica puede variar dependiendo de cómo sea realizada por el personal encargado.

En la envasadora, el intervalo de confianza inicial de [62.50 %; 81.25 %] indica que, antes de la limpieza, el nivel de contaminación era intermedio. Con una confianza del 99 %, se puede estar seguros de que este rango refleja con precisión el estado inicial de la limpieza, con variabilidad, pero aún dentro de esos límites. Para la línea de formulación, se obtuvo un intervalo de confianza de [46.14 %; 53.85 %] antes de la limpieza revela que el nivel de limpieza era más bajo, con menor variabilidad en los resultados. Esto sugiere que el área necesitaba una intervención de limpieza más significativa en comparación con la envasadora.

Después del proceso de limpieza y desinfección, el porcentaje de puntos que cumplían con los estándares de URL alcanzó el 100% tanto en la línea de formulación como en la envasadora, lo que demuestra la alta efectividad de la intervención en la eliminación de la contaminación orgánica. Todos los puntos muestreados cumplieron con los requisitos de URL, y la desviación estándar fue de 0% en ambos casos, lo que indica una uniformidad completa en el proceso, subrayando su consistencia y capacidad para cumplir con los estándares en cada muestreo. La comparación entre los resultados antes y después del proceso revela una mejora significativa. Antes de la limpieza, los porcentajes de puntos que cumplían con el estándar eran menores, representando un posible riesgo para la inocuidad del producto. Sin embargo, tras la limpieza y desinfección, se logró una eliminación efectiva de la contaminación, reflejada en el cumplimiento total del límite de URL en todos los puntos evaluados.

Por otro lado, se realizaron análisis estadísticos para validar el método en su totalidad. Según la Figura 12, el proceso de limpieza y desinfección en la línea de formulación demostró ser completamente efectivo. Se evidencia en la gráfica de caja después del proceso, donde ningún valor de URL se encuentra fuera de los límites aceptables. La ausencia de outliers o puntos fuera de rango es un fuerte indicativo de que el procedimiento de limpieza implementado garantiza la inocuidad de

los equipos en la línea de formulación. Esto sugiere que el proceso está bajo control y puede ser considerado fiable para su uso continuo en la planta.

Por otro lado, en la Figura 13, la capacidad del proceso de limpieza y desinfección ha sido validada con un valor de Cpk de 3.26, lo que sugiere que el proceso es robusto y puede garantizar la inocuidad de los equipos de producción. Los resultados muestran que el proceso cumple con los requisitos de calidad establecidos por la empresa ( $Cpk > 1.33$ ), con un riesgo muy bajo de sobrepasar los límites de contaminación permisibles. Luego, en la Figura 14, se confirma la repetibilidad del proceso, ya que las mediciones de URL muestran una variabilidad controlada dentro de los límites preestablecidos. Esto sugiere que el método de limpieza y desinfección es consistente y puede repetirse con resultados fiables, reforzando la capacidad del proceso para prevenir la contaminación microbiológica. Incluso, se proponen nuevos límites en base a los muestreos realizados, siendo el límite de control superior (LCS) de 137.425.

Se realizaron los mismos análisis estadísticos con los datos de los muestreos de la envasadora. Según la Figura 16, el proceso de limpieza en la envasadora ha reducido significativamente la contaminación, con una clara disminución en la variabilidad de los valores de URL. Todos los valores de URL después de la limpieza están por debajo del límite de 300 unidades, lo cual es aceptable según los parámetros establecidos por la planta. La mejora notable en la dispersión y la reducción de outliers por encima de 1400 unidades resalta la efectividad del protocolo de limpieza implementado.

Según la Figura 17, el Cpk de 1.43 está por encima del valor mínimo aceptable de 1.33, pero ligeramente inferior a lo que sería un proceso completamente robusto. Esto indica que el proceso es capaz y válido, pero existe cierto margen de mejora para aumentar la consistencia en la eliminación de residuos. Evaluando la repetibilidad, se observa en la Figura 18, los nuevos límites de control muestran que el proceso de limpieza en la envasadora es estable en su mayoría, con valores de URL que en general se encuentran por debajo del límite superior de control ( $LCS = 158.638$ ).

A partir de los muestreos realizados antes del proceso de limpieza y desinfección, se identificaron puntos críticos tanto en la línea de formulación como en la envasadora del fungicida, basándose en varios criterios, que se encuentran en el Cuadro 5 para la línea de formulación y en el Cuadro 8 para la envasadora. Un punto crítico se refiere a un equipo que presenta un mayor riesgo de contaminación microbiológica y acumulación de residuos. La identificación de estos puntos es útil, ya que permitirá que, en procesos de limpieza y desinfección futuros, únicamente se realicen hisopados (mediciones de URL) en estos puntos, según el protocolo propuesto en esta investigación. De esta manera, se establece un estándar que facilite el proceso de verificación de la limpieza y desinfección.

Como se observa en la **Figura 15**, los puntos críticos identificados incluyen la tolva de descarga del tanque B1, la tolva de descarga del tanque A1, el tanque B1, la válvula V9 y los tanques A3 y A4. La tolva de descarga del tanque B1 fue seleccionada como punto crítico debido a su alta exposición al ambiente, lo que incrementa la probabilidad de contaminación microbiológica. En este punto se añade goma xantana sólida, un material viscoso y de origen orgánico. Al ser un polisacárido, la goma xantana puede fomentar el crecimiento de microorganismos, ya que proporciona una fuente de nutrientes accesible para ellos, aumentando el riesgo de contaminación si los residuos no se eliminan completamente. Por esta razón, el tanque B1, donde se prepara la goma xantana, también fue identificado como un punto crítico. La tolva de descarga del tanque A1 presenta características similares, ya que su alta exposición al ambiente y la adición de sólidos elevan el riesgo de acumulación de residuos y de contaminación microbiológica.

La válvula V9, que conecta con la salida del tanque B1, también es un punto crítico porque es susceptible a la acumulación de residuos de goma xantana, los cuales pueden ser difíciles de eliminar por completo y podrían propiciar el crecimiento de microorganismos. Según el **Cuadro 4**, en estos casos, los análisis de Unidades relativas de luz (URL) mostraron que el promedio de URL estaba por encima del límite permitido, lo que indica una acumulación significativa de residuos. Finalmente, los tanques A3 y A4 fueron seleccionados como puntos críticos, ya que en ellos se mezcla la goma xantana con otras soluciones provenientes del tanque A2 para obtener el producto final, el cual a menudo se almacena por horas en estos tanques de agitación, lo que incrementa el riesgo de contaminación si no se limpian adecuadamente.

En la envasadora, se identificaron el depósito superior y los cilindros como puntos críticos, que se observan en la Figura 8. Según el Cuadro 8, El depósito superior fue clasificado como un punto crítico debido a su alta exposición al ambiente, lo que aumenta la probabilidad de contaminación microbiológica. Además, los resultados de análisis de URL indicaron que el promedio de URL en este depósito estaba por encima del límite permitido, confirmando su potencial para acumular residuos. Los cilindros, en contacto directo con el producto durante el proceso de envasado, también fueron identificados como puntos críticos. El contacto directo con el producto incrementa el riesgo de transferencia de residuos o contaminantes al producto final. Los promedios de URL en los cilindros también superaron el límite permitido, lo que destaca la necesidad de un control riguroso de la limpieza y desinfección en estos componentes.

Tomando en cuenta los hallazgos de los dos objetivos anteriores, se tomaron medidas para la prevención de contaminación microbiológica, según el Cuadro 11. La primera medida implementada fue la dosificación de hipoclorito de sodio. Se añade a una concentración de 1.5 ppm de cloro total

en el agua almacenada en el tanque de almacenamiento, tras su tratamiento de deionización. Esta concentración de cloro total efectiva para la eliminación total de microorganismos en el agua (Comisión Nacional del Agua (MX), 2023) . De esta forma se asegura que el agua no se convierta en una fuente de contaminación durante el proceso de producción. La adición de hipoclorito de sodio mantiene la calidad del agua y previene la proliferación de microorganismos, reduciendo los riesgos de contaminación del producto final.

Además, se implementó el procedimiento de limpieza y desinfección evaluado en la línea de formulación y envasado. La limpieza se realiza con una solución que contiene 0.03 cc de detergente por litro de agua, mientras que la desinfección se lleva a cabo con 0.6 mililitros de desinfectante puro por litro de agua. Estas concentraciones están diseñadas para asegurar una eliminación adecuada de residuos y microorganismos en las superficies de la línea de producción. La precisión en las concentraciones de detergente y desinfectante es fundamental para maximizar la eficacia del proceso de limpieza y desinfección, garantizando así que las superficies se mantengan libres de contaminantes. Si se usan cantidades inferiores a las recomendadas, es posible que no se logre la eliminación completa de los residuos y microorganismos, lo que podría comprometer la seguridad del producto final. Por otro lado, si se exceden las concentraciones, no solo se incrementan los costos innecesariamente, sino que también existe el riesgo de que los residuos de estos productos queden en las superficies, lo que podría generar problemas de contaminación química o afectar la calidad del producto (ECOLAB, 2023).

Por último, se implementó un análisis microbiológico del agua clorada para llevar control su inocuidad. El muestreo y análisis se realizan utilizando el método de láminas de inmersión, lo cual ayuda a controlar la inocuidad del agua antes de su uso en la producción. Esta práctica puede detectar posibles contaminaciones y asegurar que el agua utilizada en el proceso no represente un riesgo para la calidad del producto. Al monitorear la calidad del agua, se previene que esta se convierta en una fuente de contaminación y se mantiene la integridad del producto final.

Como se observa en los Cuadros 9 y 10, los resultados del análisis microbiológico del producto semiterminado y terminado reflejan una mejora significativa tras la implementación de las medidas preventivas. Antes de estas intervenciones, los recuentos de microorganismos en el producto semiterminado eran elevados, con valores que superaban ampliamente el límite permitido, mostrando recuentos totales aeróbicos de  $6.77E+05$  UFC/mL,  $8.00E+05$  UFC/mL y  $6.67E+05$  UFC/mL. Estos valores evidenciaban una alta carga microbiológica, lo que indicaba la ineficacia de las medidas de control anteriores para mantener los estándares de inocuidad requeridos.

Después de implementar las medidas preventivas, que incluyeron la dosificación de hipoclorito de sodio en el agua, mejoras en los procedimientos de limpieza y desinfección, y análisis microbiológicos del agua, los recuentos de microorganismos en el producto semiterminado se redujeron a niveles inferiores a 10 UFC/mL en todas las muestras. Este resultado, reportado como "menor a 10", sugiere niveles de contaminación prácticamente nulos o muy bajos, demostrando la efectividad de las nuevas medidas adoptadas.

De manera similar, los recuentos microbiológicos del producto terminado antes de la implementación de las medidas preventivas también mostraban niveles elevados de contaminación, con valores de  $1.40E+06$  UFC/mL,  $1.13E+06$  UFC/mL y  $7.33E+05$  UFC/mL, los cuales no cumplían con los estándares de calidad requeridos y representaban un riesgo considerable para la inocuidad del producto final. Sin embargo, tras la aplicación de las medidas preventivas, los recuentos en el producto terminado disminuyeron a menos de 10 UFC/mL en todas las muestras, confirmando la eficacia de las intervenciones y garantizando que el producto final cumplía con los estándares de calidad e inocuidad.

Tomando esto en cuenta, se propone un protocolo para la prevención de contaminación microbiológica, que se encuentra en la sección VII.E de resultados. Se puede observar que el alcance de este es específicamente para la prevención de contaminación microbiológica en un fungicida de suspensión concentrada. Uno de los factores más importantes para este proceso es el establecimiento de roles y responsabilidades, los cuales se muestran en el Cuadro 12. Establecer quién se encarga de cada tarea evita confusiones y mejora la eficiencia operativa, al mismo tiempo que asegura responsabilidad y altos estándares de calidad. Una correcta asignación de roles facilita la comunicación, el cumplimiento de normativas y la identificación futuros de problemas.

Además, se mencionan todas las actividades a realizar para cumplir el objetivo del protocolo. Primero, se menciona la necesidad de llevar un control de la calidad de agua, realizando análisis de cloro y microbiológicos de esta. En gran cantidad de industrias se lleva a cabo esta actividad, especialmente en la industria de alimentos. En este caso en específico, se suelen realizar más análisis y con mayor frecuencia. De esta forma, se gestiona la idoneidad del agua desde el punto de vista sanitario. Asimismo, para asegurar que las operaciones de higienización y control del agua se lleven a cabo adecuadamente es útil contar con un sistema de registro detallado que incluya los controles efectuados, los resultados obtenidos, las incidencias reportadas, las medidas correctivas tomadas, los responsables de cada tarea y los análisis de laboratorio realizados, entre otros aspectos. Cada instalación puede adaptar su sistema de registros para satisfacer sus necesidades operativas específicas (Siggo - Calidad y gestión científica, 2021).

Por otro lado, se debe subrayar la importancia de la limpieza y desinfección de la línea de producción, así como la evaluación de su eficacia. Se encuentran numerosos protocolos que incluyen estas actividades. Según la guía elaborada por Hygiene Internacional, 2013, evaluar la limpieza de las superficies de forma instantánea permite corregir problemas rápidamente, reduciendo el uso de pruebas microbiológicas tradicionales. Esto mejora la capacitación, optimiza los recursos y asegura altos niveles de limpieza. Además, protege la calidad del producto, evita retiros del mercado y ayuda a cumplir con normativas al registrar y monitorear resultados para identificar áreas de mejora.

Luego, se detalla la necesidad de realizar en cada lote producido el análisis de los productos semiterminados y terminados. El análisis microbiológico de fungicidas está enfocado solo en el conteo total aeróbico es adecuado debido a la naturaleza y uso del producto. A diferencia de la industria alimentaria, donde el control de patógenos específicos es indispensable para la salud humana, los fungicidas están diseñados específicamente para eliminar o inhibir microorganismos dañinos en cultivos o superficies. No están destinados al consumo, por lo que la identificación de patógenos como *Salmonella* o *E. coli* no considera necesario. Además, en la industria de los productos químicos y biocidas, los requisitos normativos generalmente no son tan estrictos en cuanto al análisis microbiológico detallado como en la industria alimentaria, que se rigen por normas mejor establecidas (Fundación INTAL- Instituto de ciencia y tecnología alimentaria, 2024).

Finalmente, según el protocolo propuesto, todos los resultados de los análisis, incluyendo el análisis de agua, la validación de la limpieza, y el análisis del producto semiterminado y terminado, deben ser reportados a los managers responsables. Esta práctica garantiza que cada etapa del proceso de producción cumpla con los estándares establecidos por la empresa y permita una evaluación antes de proceder con la liberación del producto. Al informar a los gerentes correspondientes, se asegura que la toma de decisiones sobre la liberación del producto se base en datos completos y actualizados, facilitando así el cumplimiento de los requisitos de inocuidad en el punto adecuado de la línea de producción.

En caso de que se contamine un producto al final, el protocolo también especifica las acciones correctivas necesarias, las cuales incluyen la eliminación del lote afectado, una revisión inmediata del protocolo de limpieza y desinfección, y la implementación de medidas adicionales para evitar la recurrencia de la contaminación. Esto asegura que, ante cualquier incidencia, se actúe de manera rápida y eficaz para proteger la calidad del producto.

## IX. Conclusiones

- El análisis microbiológico reveló que el agua utilizada en el proceso de producción era la principal fuente de contaminación microbiológica, con recuentos aeróbicos en promedio de  $13\ 000 \pm 650$  UFC/mL, superiores al límite aceptable. La implementación de medidas correctivas, como la adición de hipoclorito de sodio ayuda a prevenir la contaminación cruzada y asegurar la inocuidad microbiológica del fungicida.
- La validación del método de limpieza y desinfección en la línea de producción de fungicida, utilizando ATP como indicador, demostró ser eficaz y consistente. Los puntos de muestreos que cumplen mejoraron del 51.28 % al 100% en la línea de formulación y del 68.75 % al 100% en la envasadora tras la limpieza. El proceso mostró robustez con un Cpk de 3.26 en formulación y 1.43 en envasadora, ambos superiores al mínimo aceptable ( $Cpk > 1.33$ ). Además, la gráfica de repetibilidad confirmó que el proceso es estable, con valores dentro de los límites de control, lo que subraya la consistencia de la limpieza. La identificación de puntos críticos permitirá optimizar futuras limpiezas y prevenir la contaminación microbiológica de manera efectiva.
- Los análisis microbiológicos del producto semiterminado y terminado antes y después de implementar las medidas preventivas mostraron una mejora en la calidad microbiológica. Los recuentos de microorganismos en el producto semiterminado y terminado se redujeron a niveles inferiores a 10 UFC/mL tras la implementación de las medidas preventivas. Esto confirma que las intervenciones realizadas han sido efectivas para cumplir con los estándares de inocuidad internos y garantizar la calidad del producto final.

## **X. Recomendaciones**

- Capacitar continuamente al personal, pues es necesaria para mantener altos estándares de calidad e inocuidad. Se debe proporcionar formación regular sobre los procedimientos de limpieza, desinfección y manejo de equipos, así como sobre la importancia de seguir el protocolo propuesto.
  
- Revisar y actualizar el protocolo de prevención de contaminación microbiológica de manera periódica. Esto incluye evaluar la efectividad del protocolo en base a los resultados de las pruebas microbiológicas y adaptar las medidas a nuevas necesidades o desafíos. La actualización continua del protocolo ayudará a mantener la calidad del producto y la seguridad en la planta de producción.
  
- Mantener un sistema de registro detallado de todas las actividades relacionadas con el control de calidad, limpieza, y pruebas microbiológicas es fundamental. Los registros deben incluir resultados de análisis, incidentes reportados, medidas correctivas tomadas, y la responsabilidad de cada tarea. Una documentación facilitará el seguimiento y la mejora continua del proceso de producción.
  
- Evaluar e implementar nuevas tecnologías para la monitorización y control de la contaminación microbiológica. Tecnologías avanzadas pueden ofrecer mejores soluciones para la detección temprana y control de contaminantes, contribuyendo a una mayor eficacia en la prevención de la contaminación.
  
- Las instalaciones deben estar diseñadas para facilitar la limpieza y desinfección, con superficies lisas, no porosas y resistentes a la corrosión. Es importante establecer un flujo unidireccional de materiales y personal para evitar cruces entre áreas sucias y limpias. Además, se deben instalar sistemas de ventilación con filtros HEPA para reducir la presencia de microorganismos en el aire y contar con un programa de control de plagas que evite la entrada de insectos, roedores y otros vectores de contaminación.

- Utilizar tuberías fabricadas con materiales resistentes a la corrosión y fáciles de limpiar, como el acero inoxidable. Evitar materiales porosos o que puedan degradarse con el tiempo, ya que pueden acumular residuos y favorecer el crecimiento de microorganismos.

## XI. Bibliografía

- Merck KGaA. (2024). *Contact YM(R)*. Obtenido de Merck Millipore: [https://www.merckmillipore.com/GT/es/product/Contact-YMR,MDA\\_CHEM-102139](https://www.merckmillipore.com/GT/es/product/Contact-YMR,MDA_CHEM-102139)
- Al-Rub, F. A. (2020). *Cleaning and Disinfection*. Jordan University of Science and Technology.
- Barrios, A. (2011). *Caracterización funcional de la comunidad bacteriana cultivable aislada del suelo de la zona de descarga de la fosa petrolera Bare-9. San Tomé. Edo. Anzoátegui*. Venezuela: Central University of Venezuela .
- Chatterjee, A., & Abraham, J. (2018). Microbial Contamination, Prevention, and Early Detection in Food Industry. En A. Chatterjee, & J. Abraham, *Microbial Contamination and Food Degradation* (Vols. 21-47). Academic Press. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811515-2.00002-0>
- Clark, T. (2018). *Stine seed*. Obtenido de Importance of fungicides: <https://www.stinseed.com/blog/importance-of-fungicides/>
- Comisión Nacional del Agua (MX). (2023). *Manual de Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento - Evaluación Rápida de Plantas Potabilizadoras*. C.P. 04340, Coyoacán, México, D.F.: Insurgentes Sur No. 2416 Col. Copilco El Bajo.
- Croda International Plc. (2024). *Modificadores Reológicos*. Obtenido de CRODA: <https://www.crodacropcare.com/es-mx/technologies/rheology-modifiers>
- DUWEST Guatemala, S.A. (2022). *Mancozeb 80*. Obtenido de DUWEST Guatemala, S.A.: <https://duwest.com/product/fungicidas/mancozeb-80-wp/>
- ECOLAB. (2023). Obtenido de Detergentes y desinfectantes: <https://es-es.ecolab.com/>
- Fundación INTAL- Instituto de ciencia y tecnología alimentaria. (2024). *La importancia del análisis microbiológico en la industria alimentaria*. Obtenido de INTAL.
- Gianessi, L. P., & Reigner, N. (2005). *The Value of Fungicides In U.S. Crop Production*. Crop Protection Research Institute. Washington DC 20005: CropLife Foundation.
- Grupo PochTeca Guatemala. (2022). *Los antiespumantes y sus aplicaciones*. Obtenido de Pochteca: <https://guatemala.pochteca.net/los-antiespumantes-y-su-amplio-abanico-de-aplicaciones/>

- Hygiene Internacional. (2013). *hygiene-monitoring-guide*. Obtenido de Guía para el monitoreo de higiene ATP: <https://bcaplicaciones.com/wp-content/uploads/2023/01/hygiene-monitoring-guide-revb-042013-7-ESPANOL.pdf>
- Intagri S.C. (2017). *Coadyuvantes para Potencializar el Rendimiento de los Plaguicidas*. (Artículos Técnicos de INTAGRI) Obtenido de Intragri: <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/coadyuvantes-para-potencializar-el-rendimiento-de-los-plaguicidas>
- Kepler. (2022). Obtenido de La cuantificación del ATP como herramienta de monitorización de la actividad microbiológica: <https://www.kepler.es/cuantificacion-atp-actividad-microbiologica/>
- Kulkarni, D. G. (2020). *Plant Pathology Microbiology & Disease Managment*. Benzonji Science College, Lakhotia.
- McGrath, M. (2016). *What are Fungicides?* (Cornell University) Obtenido de APS: <https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Pages/Fungicides.aspx>
- MicroPlanet. (2016). *Luminómetro para detección de residuos orgánicos*. Obtenido de MVP ICON®: <https://www.microplanet-psl.com/es/blog/mvp-icon-deteccion-bioluminiscente/>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. (2023). *Sectores Agroalimentario y Pesquero*. España: Gobierno de España.
- Montañez, V. (2013). *Métodos convencionales, rápidos y alternativos para el control microbiológico de la higiene de superficies*. . Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Perscador, D. (18 de noviembre de 2022). La goma xantana, el aditivo que puede ayudar a tus bacterias. *Consumo Claro*, pág. 2.
- Sanga, M. (2010). *Sanitation - Cleaning and Disinfection in Food Industry*. Alemania: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Servicio Ecuatoriano de Normalización. (2016). *INEN*. Obtenido de Validación y Certificación: <https://ininvalidacionyvalidacion.blogspot.com/2016/09/validacion-de-metodos-de-ensayo.html>
- Siggo - Calidad y gestión científica . (2021). *Higiene Ambiental*. Obtenido de Plan de control del agua en la industria alimentaria, un prerrequisito para la seguridad de los alimentos: <https://higieneambiental.com/plan-de-control-del-agua-en-la-industria-alimentaria-un-prerrequisito-para-la-seguridad-de-los-alimentos>

- Silva, E., Ortiz, J., Murillo, C., Nava, G., C., & Cardenas, O. (2007). *Estudio de caracterización de la calidad microbiológica y fisicoquímica del agua utilizada en la industria de alimentos.* Bogotá: Grupo de Salud Ambiental “Jaime Eduardo Ortiz Varón”, Subdirección Red Nacional de Laboratorios, Instituto Nacional de Salud.
- Srirama M. Bhairi, P., & Chandra Mohan, P. (2007). *Detergents - A guide to the properties and uses of detergents in biological systems.* San Diego, CA: Calbiochem.
- Syngenta. (septiembre de 2022). *Amistar*. Obtenido de Syngenta Argentina: <https://www.syngenta.com.ar/product/crop-protection/fungicida/amistar>
- SYS Solutions, S.A. (2023). *Clorotalonil 72 SC LT*. Obtenido de MaxiAgro : <https://maxiagro.com.gt/product/clorotalonil-72-sc-lt/>
- The Lubrizol Company. (2022). *Aspectos básicos de los dispersantes - Por qué usar un dispersante en pinturas y recubrimientos* . Obtenido de Lubrizol: <https://espanol.lubrizol.com/Coatings/Blog/2022/07/Dispersants-101>

## XII. Apéndice

### A. Datos originales

**Cuadro 14.** Conteo aeróbico total de cada materia prima

Materia prima	Conteo aeróbico total de muestra 1 (UFC/mL)	Conteo aeróbico total de muestra 2 (UFC/mL)	Conteo aeróbico total de muestra 3 (UFC/mL)
Ingrediente activo	<10	<10	<10
Agua	17000 ± 856.5	12000 ± 608.3	10000 ± 509.9
Dispersante 1	<10	<10	<10
Dispersante 2	<10	<10	<10
Dispersante 3	<10	<10	<10
Dispersante 4	<10	<10	<10
Dispersante 5	<10	<10	<10
Colorante	<10	<10	<10
Espesante (goma chantan)	<10	<10	<10
Adhesivo	<10	<10	<10
Antiespumante	<10	<10	<10

Se observa el recuento total aeróbico en las diferentes muestras de materia prima, Los datos se obtuvieron por medio del método M66: USP 43 NF 38 Farmacopea de los Estados Unidos.

**Cuadro 15.** Unidades relativas de luz en puntos de muestreo de línea de formulación

Muestreo	Lugar	URL antes del proceso de limpieza ( $\pm 10$ URL)		URL posterior al proceso de limpieza ( $\pm 10$ URL)	
		URL	Cumplimiento	URL	Cumplimiento
1	Tanque B1	4872	NO CUMPLE	51	CUMPLE
	Tolva de tanque B1	319	NO CUMPLE	57	CUMPLE
	Válvula V9	5000	NO CUMPLE	124	CUMPLE
	Válvula V6	469	NO CUMPLE	87	CUMPLE
	Bomba de succión	13	CUMPLE	10	CUMPLE
	Válvula V1	13	CUMPLE	9	CUMPLE
	Válvula V2	321	NO CUMPLE	140	CUMPLE
	Tonelito	386	NO CUMPLE	135	CUMPLE
	Tanque A1	9	CUMPLE	9	CUMPLE
	Tolva de tanque A1	423	NO CUMPLE	50	CUMPLE
	Tanque A1	7	CUMPLE	6	CUMPLE
	Tanque A3	14	CUMPLE	14	CUMPLE
	Tanque A4	9	CUMPLE	8	CUMPLE
	<b>Porcentaje que cumple</b>	<b>46.15%</b>		<b>100%</b>	
2	Tanque B1	405	NO CUMPLE	6	CUMPLE
	Tolva de tanque B1	540	NO CUMPLE	136	CUMPLE
	Válvula V9	1862	NO CUMPLE	139	CUMPLE
	Válvula V6	305	NO CUMPLE	57	CUMPLE
	Bomba de succión	103	CUMPLE	58	CUMPLE
	Válvula V1	78	CUMPLE	80	CUMPLE
	Válvula V2	405	NO CUMPLE	95	CUMPLE
	Tonelito	280	CUMPLE	140	CUMPLE
	Tanque A1	11	CUMPLE	19	CUMPLE
	Tolva de tanque A1	1462	NO CUMPLE	17	CUMPLE
	Tanque A1	9	CUMPLE	60	CUMPLE
	Tanque A3	17	CUMPLE	89	CUMPLE
	Tanque A4	14	CUMPLE	18	CUMPLE
	<b>Porcentaje que cumple</b>	<b>53.85%</b>		<b>100%</b>	

Continuación de Cuadro 13...

3	Tanque B1	598	NO CUMPLE	56	CUMPLE
	Tolva de tanque B1	405	NO CUMPLE	164	CUMPLE
	Válvula V9	1578	NO CUMPLE	98	CUMPLE
	Válvula V6	359	NO CUMPLE	78	CUMPLE
	Bomba de succión	403	NO CUMPLE	17	CUMPLE
	Válvula V1	64	CUMPLE	87	CUMPLE
	Válvula V2	298	CUMPLE	67	CUMPLE
	Tonelito	189	CUMPLE	104	CUMPLE
	Tanque A1	65	CUMPLE	14	CUMPLE
	Tolva de tanque A1	763	NO CUMPLE	34	CUMPLE
	Tanque A1	23	CUMPLE	96	CUMPLE
	Tanque A3	30	CUMPLE	95	CUMPLE
	Tanque A4	11	CUMPLE	25	CUMPLE
	<b>Porcentaje que cumple</b>	<b>53.84%</b>		<b>92.30%</b>	

Se observa las unidades relativas de luz obtenidas en los puntos de muestreos en la línea de formulación obtenidos mediante la utilización de un luminómetro. El límite máximo permitido es de 300 URL.


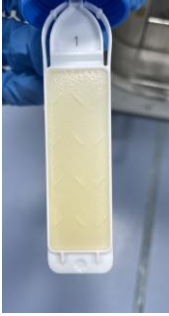

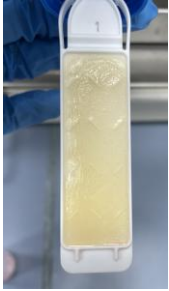
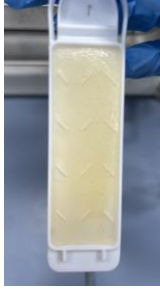
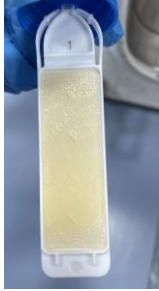
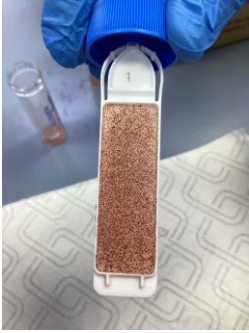


**Cuadro 16.** Unidades relativas de luz en puntos de muestreo de envasadora

Muestreo	Lugar	URL antes del proceso de limpieza ( $\pm 10$ URL)		URL posterior al proceso de limpieza ( $\pm 10$ URL)	
1	Boquilla 1	27	CUMPLE	20	CUMPLE
	Boquilla 3	11	CUMPLE	11	CUMPLE
	Boquilla 5	8	CUMPLE	7	CUMPLE
	Boquilla 7	12	CUMPLE	12	CUMPLE
	Depósito superior	<b>397</b>	NO CUMPLE	240	CUMPLE
	Depósito superior	<b>948</b>	NO CUMPLE	257	CUMPLE
	Manguera 2	7	CUMPLE	6	CUMPLE
	Manguera 4	7	CUMPLE	7	CUMPLE
	Manguera 6	5	CUMPLE	6	CUMPLE
	Manguera 8	6	CUMPLE	5	CUMPLE
	Cilindro 1	<b>832</b>	NO CUMPLE	234	CUMPLE
	Cilindro 3	<b>370</b>	NO CUMPLE	156	CUMPLE
	Cilindro 5	<b>791</b>	NO CUMPLE	245	CUMPLE
	Cilindro 8	<b>370</b>	NO CUMPLE	215	CUMPLE
	Tubería 1	10	CUMPLE	10	CUMPLE
	Tubería 2	28	CUMPLE	14	CUMPLE
	<b>Nivel de limpieza total</b>		<b>62.5%</b>		<b>100%</b>
2	Boquilla 1	46	CUMPLE	15	CUMPLE
	Boquilla 3	17	CUMPLE	20	CUMPLE
	Boquilla 5	6	CUMPLE	40	CUMPLE
	Boquilla 7	11	CUMPLE	13	CUMPLE
	Depósito superior	<b>678</b>	NO CUMPLE	138	CUMPLE
	Depósito superior	<b>1376</b>	NO CUMPLE	189	CUMPLE
	Manguera 2	84	CUMPLE	14	CUMPLE
	Manguera 4	96	CUMPLE	25	CUMPLE
	Manguera 6	13	CUMPLE	13	CUMPLE
	Manguera 8	97	CUMPLE	11	CUMPLE
	Cilindro 1	<b>634</b>	NO CUMPLE	239	CUMPLE
	Cilindro 3	<b>629</b>	NO CUMPLE	259	CUMPLE
	Cilindro 5	<b>912</b>	NO CUMPLE	250	CUMPLE
	Cilindro 8	<b>717</b>	NO CUMPLE	152	CUMPLE
	Tubería 1	54	CUMPLE	17	CUMPLE

<b>Continuación de Cuadro 14...</b>					
	Tubería 2	12	CUMPLE	30	CUMPLE
	<b>Nivel de limpieza total</b>	<b>62.5%</b>		<b>100%</b>	
<b>3</b>	Boquilla 1	15	CUMPLE	27	CUMPLE
	Boquilla 3	21	CUMPLE	41	CUMPLE
	Boquilla 5	37	CUMPLE	77	CUMPLE
	Boquilla 7	17	CUMPLE	13	CUMPLE
	Depósito superior	<b>305</b>	NO CUMPLE	197	CUMPLE
	Depósito superior	<b>378</b>	NO CUMPLE	234	CUMPLE
	Manguera 2	15	CUMPLE	9	CUMPLE
	Manguera 4	21	CUMPLE	8	CUMPLE
	Manguera 6	16	CUMPLE	5	CUMPLE
	Manguera 8	10	CUMPLE	4	CUMPLE
	Cilindro 1	25	CUMPLE	175	CUMPLE
	Cilindro 3	<b>390</b>	NO CUMPLE	182	CUMPLE
	Cilindro 5	<b>478</b>	NO CUMPLE	98	CUMPLE
	Cilindro 8	<b>309</b>	NO CUMPLE	213	CUMPLE
	Tubería 1	105	CUMPLE	19	CUMPLE
	Tubería 2	196	CUMPLE	13	CUMPLE
		<b>Nivel de limpieza total</b>	<b>68.75%</b>		<b>100.00%</b>

Se observa las Unidades relativas de luz obtenidas en los puntos de muestreos en la envasadora obtenidos mediante la utilización de un luminómetro. El límite máximo permitido es de 300 URL.

**Cuadro 17.** Láminas de inmersión resultantes de análisis de agua

Ubicación de toma de muestra	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Cisterna			
Agua sin tratamiento			
Tanque de almacenamiento de agua tratada			

Se observan las láminas de inmersión para determinar presencia de microorganismos en líquidos marca Merck. Los puntos rojos indican la presencia de Unidades Formadoras de Colonias en la muestra.

**Cuadro 18.** Conteo microbiológico de muestras de producto semiterminado

	Conteo aeróbico total de muestra 1 (UFC/mL)	Conteo aeróbico total de muestra 2 (UFC/mL)	Conteo aeróbico total de muestra 3 (UFC/mL)
Antes de la implementación de medidas preventivas	2.00E+04 ± 1005	2.00E+06 ± 100 00	1.00E+04 ± 509.9
	2.00E+06 ± 100 00	1.00E+05 ± 5 001	3.00E+0 + 15 000
	1.00E+05 ± 5001	9.00E+05 ± 45 000.2	1.00E+06 ± 50 000
Después de la implementación de medidas preventivas	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0

Se observa el recuento total aeróbico en las diferentes muestras de producto semiterminado, Los datos se obtuvieron por medio del método M66: USP 43 NF 38 Farmacopea de los Estados Unidos.

**Cuadro 19.** Conteo microbiológico de producto terminado

	Conteo aeróbico total de muestra 1 (UFC/mL)	Conteo aeróbico total de muestra 2 (UFC/mL)	Conteo aeróbico total de muestra 3 (UFC/mL)
Antes de la implementación de medidas preventivas	2.00E+05 ± 10 000	3.00E+06 ± 150 00	1.00E+06 ± 50 000
	2.00E+06 ± 100 00	1.00E+06 ± 50 000	4.00E+05 ± 20 00
	1.30E+06 ± 65 00	8.00E+05 ± 40 000	1.00E+05 ± 5001
Después de la implementación de medidas preventivas	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0

Se observa el recuento total aeróbico en las diferentes muestras de producto terminado, Los datos se obtuvieron por medio del método M66: USP 43 NF 38 Farmacopea de los Estados Unidos.

## B. Cálculos de muestra

**Cálculo 1:** Conteo total aerobio

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{Número de colonias}}{\text{Volumen sembrado (ml)}}$$

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{13}{10^{-3}} = 13\ 000$$

En este análisis, se determinan las unidades formadoras de colonias (UFC) a partir del número de colonias contadas en la placa y la dilución realizada. Se realizó de la misma forma para la toma de datos de todos los conteos realizados de materia prima y de producto semiterminado y terminado. Los resultados se muestran en los Cuadros 14, 18 y 19.

## C. Cálculos de análisis de error

**Cálculo 2:** Promedio de recuento total aeróbico en agua

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N}$$
$$\bar{X} = \frac{17\ 000 + 12\ 000 - 10\ 000}{3} = 13\ 000 \text{ UFC/mL}$$

Se determinó el promedio del recuento total aeróbico en la muestra de agua. Los datos se extrajeron del Cuadro 14. Se realizó el mismo cálculo para determinar el promedio del nivel de limpieza de la línea de producción y del análisis microbiológico del producto semiterminado y terminado. Los resultados se exponen en los Cuadros 20-25.

**Cálculo 3:** Desviación estándar de recuento total aeróbico en agua

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

$$S = \sqrt{\frac{(17\,000 - 13\,000)^2 + (12\,000 - 13\,000)^2 + (10\,000 - 13\,000)^2}{2}}$$

$$S = 3605.55 \text{ UFC/mL}$$

Se determinó la desviación estándar del recuento total aeróbico en la muestra de agua. Los datos se extrajeron del Cuadro 14. Se realizó el mismo cálculo para determinar la desviación estándar del nivel de limpieza y del análisis microbiológico del producto semiterminado y terminado. Los resultados se exponen en los Cuadros 20-25.

**Cálculo 4:** Intervalo de confianza de porcentaje de nivel de limpieza en línea de formulación

$$I.C = \bar{X} \pm Z_{\alpha/2} * \frac{S}{\sqrt{N}}$$

$$I.C = 51.28\% \pm 2.576 * \frac{4.44\%}{\sqrt{2}}$$

$$I.C = [46.14\%; 53.85\%]$$

Se calculó el intervalo de confianza del nivel de limpieza de la línea de formulación. Los datos utilizados del promedio y desviación estándar se determinaron según el cálculo 1 y 2. Se realiza el mismo cálculo para determinar el nivel de limpieza en el envasado. Los resultados se muestran en el Cuadro 21 y 22.

**Cálculo 5:** Incertidumbres de conteos totales aerobios

$$U_{dilución}^2 = 0.05 * (17 \times 103) = 0.05 * 17,000 = 850$$

$$Uc = \sqrt{U_{medición}^2 + U_{dilución}^2}$$

$$Uc = \sqrt{100^2 + 850^2}$$

$$Uc = \sqrt{10\,000 + 722,500}$$

$$Uc = \sqrt{731,500} = 856.5$$

Se calculó la incertidumbre del conteo total aerobio del agua. Los datos se obtuvieron directamente de los equipos de medición o del método de conteo. Se realizó el mismo cálculo para calcular el resto de las incertidumbres de los conteos totales aerobios.

**D. Datos calculados****Cuadro 20.** Promedio y desviación estándar de recuento total aeróbico de materias primas

<b>Materia prima</b>	<b>Promedio (UFC/mL)</b>	<b>Desviación estándar (UFC/mL)</b>
Ingrediente activo	<10	0
Agua	13000 ± 650	3605.55
Dispersante 1	<10	0
Dispersante 2	<10	0
Dispersante 3	<10	0
Dispersante 4	<10	0
Dispersante 5	<10	0
Colorante	<10	0
Espesante (goma chantan)	<10	0
Adhesivo	<10	0
Antiespumante	<10	0

El Cuadro expone los resultados obtenidos a partir del cálculo 1 y 2 en la sección B, con los datos del Cuadro 14.

**Cuadro 21.** Análisis de error de nivel de limpieza en línea de formulación

	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Intervalo de confianza</b>
<b>Antes de proceso de limpieza y desinfección</b>	51.28%	4.44%	[46.14%; 53.85%]
<b>Después de proceso de limpieza y desinfección</b>	100%	0.00%	[100% ; 100%]

Los datos expuestos se obtuvieron según los cálculos 1,2 y 3 de la sección B, a partir de los datos expuestos en el Cuadro 15.

**Cuadro 22.** Análisis de error de nivel de limpieza en envasadora

	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Intervalo de confianza</b>
Antes de proceso de limpieza y desinfección	68.75%	4.44%	[62.50%; 81.25%]
Después de proceso de limpieza y desinfección	100.00%	0.00%	[100%; 100%]

Los datos expuestos se obtuvieron según los cálculos 1,2 y 3 de la sección B. a partir de los datos expuestos en el Cuadro 16.

**Cuadro 23.** Análisis de error de conteo total aerobio en producto semiterminado

	<b>Promedio (UFC/mL)</b>	<b>Desviación estándar (UFC/mL)</b>
Antes de la implementación de medidas preventivas	6.77E+05 ± 33 850	1.15E+04
	8.00E+05 ± 40 000	1.04E+04
	6.67E+05 ± 33 350	4.93E+04
Después de la implementación de medidas preventivas	0	0
	0	0
	0	0

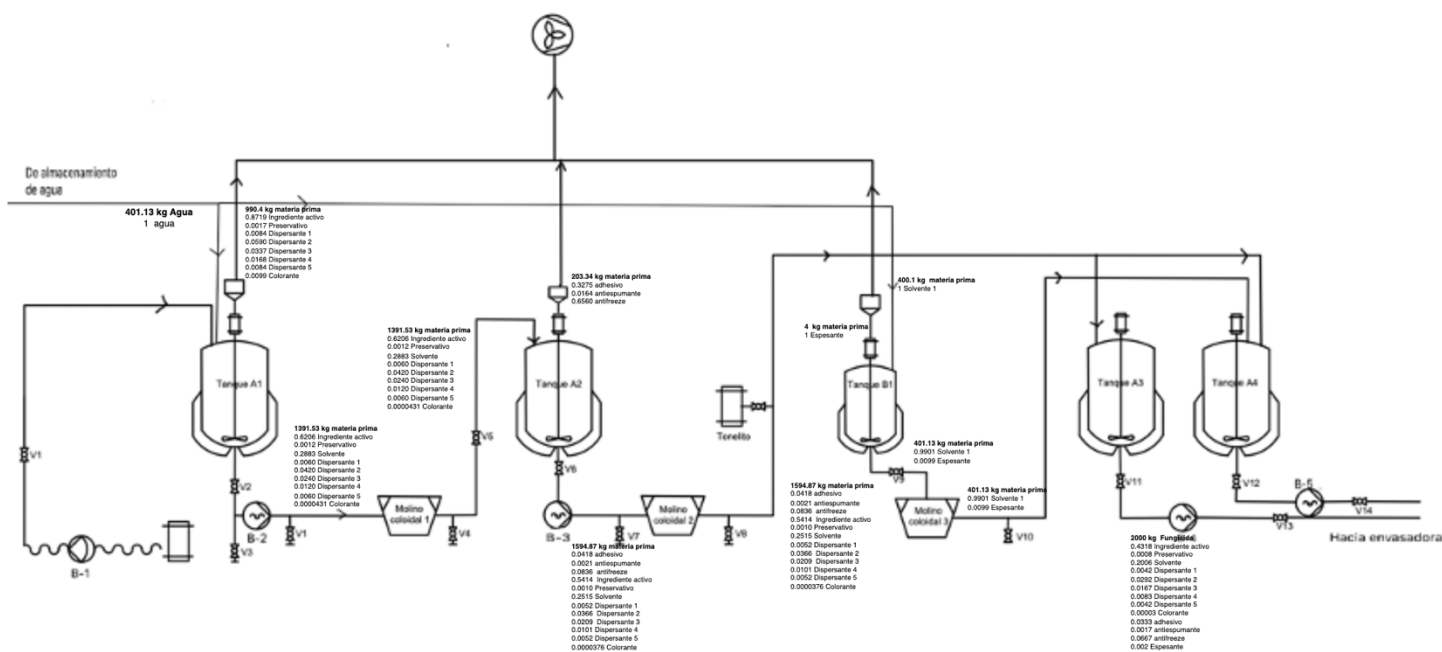
Los datos expuestos se obtuvieron según los cálculos 1 y 2 de la sección B a partir de los datos expuestos en el Cuadro 178

**Cuadro 24.** Análisis de error de conteo total aerobio de producto terminado

	Promedio (UFC/mL)	Desviación estándar (UFC/mL)
Antes de la implementación de medidas preventivas	1.40E+06 ± 70 000	1.44E+05
	1.13E+06 ± 56 000	8.08E+05
	7.33E+05 ± 36 6500	6.03E+04
Después de la implementación de medidas preventivas	0	0
	0	0
	0	0

Los datos expuestos se obtuvieron según los cálculos 1 y 2 de la sección B. a partir de los datos expuestos en el Cuadro 19.

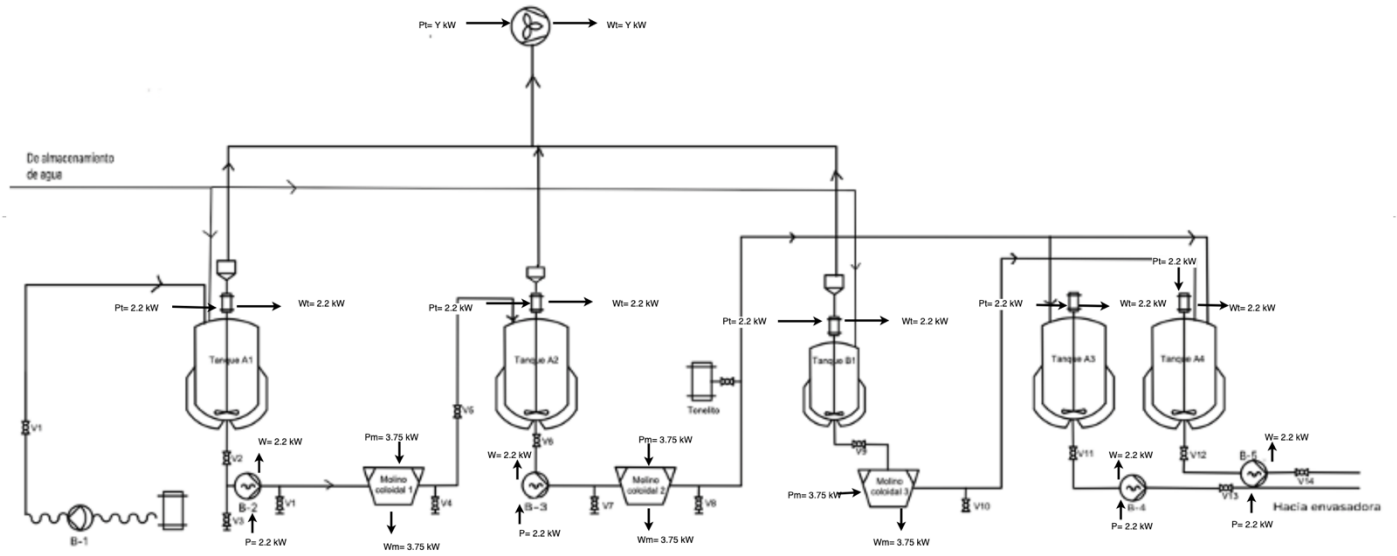
### E. Balance de materia real



**Figura 21.** Balance de materia real de producción de fungicida

**Nota.** Elaboración propia

## F. Balance de energía real



**Figura 22.** Balance de energía real de producción de fungicida

**Nota.** Elaboración propia

## **G. Metodologías en protocolo de prevención de contaminación microbiológica**

### **1. Metodología de toma de muestra de agua**

#### Materiales:

- Frascos estériles de boca ancha con tapa de rosca o bolsas estériles con cierre hermético de tamaño Nota: Dependiendo del caso- con tiosulfato y sin tiosulfato de sodio.
- Bata, cofia, cubrebocas y guantes estériles.
- Frasco o aspersor con Etanol al 70 % (v/v) o sanitizantes en USO.
- Hielera de poliestireno o de otro material aislante con tapa.
- Marcador indeleble
- Etiquetas autoadheribles.
- Colorímetro portátil o comparador visual para determinación de cloro residual

#### Procedimiento

- a. La selección de puntos de muestreo debe considerarse para cada sistema de abastecimiento en particular, considerando algunos criterios, por ejemplo:
  - i. Puntos de muestreo representativos de las diferentes fuentes de agua del sistema
  - ii. Lugares más susceptibles de contaminación. "puntos críticos"
- b. Lavarse manos y antebrazos con agua y jabón, colocarse guantes, cubreboca, bata y cofia.
- c. Asperjar alcohol al 70 % o sanitizante en uso sobre la superficie y boca del grifo.
- d. Dejar correr el agua aproximadamente 3 min hasta asegurarse que el agua que contenían las tuberías ha sido renovada o que la temperatura del agua sea estabilizada antes de tomar la muestra.
- e. Reducir el volumen en flujo para permitir el llenado del frasco sin salpicaduras.
- f. En el caso de frascos estériles desechables desprender y eliminar el sello de seguridad y mantener la tapa con la rosca hacia abajo En el caso de uso de bolsas estériles desprender y eliminar el sello de seguridad de la bolsa.
- g. Proceder a tomar la muestra sin enjuagar el frasco dejando el espacio libre requerido para la agitación de la muestra previa al análisis (aproximadamente 10 % de volumen del frasco).
- h. Efectuada la toma de muestra, deben colocarse el tapón con el papel de protección o la tapa al frasco; en el caso de las bolsas proceder al cerrado hermético.
- i. Trasladar a laboratorio de control de calidad en una hielera.

- j. Refrigerar las muestras hasta su uso a una temperatura entre 0 – 10 grados Celsius (El análisis de las muestras es válido hasta 24 horas luego de su toma)

## **2. Metodología de limpieza y desinfección en línea de formulación**

### Materiales para línea de formulación:

- Detergente al 3 % (v/v) % (0.03 cc por cada litro de agua). Se utilizará un total de 600 L.
- Desinfectante al 0.2 % (v/v) % (0.2 cc por cada 100 litros de agua). Se utilizará un total de 300 L.

### Procedimiento de limpieza y desinfección de línea de formulación:

- a. **Enjuague con agua:** Antes de iniciar el proceso de limpieza, se debe realizar un barrido con agua en todo el proceso de formulación.
- b. **Limpieza de detergente:**
  - i. Preparar en un tonel previamente limpio la solución de detergente al 3 % (0.03 cc de detergente por cada litro de agua). Se utilizará un volumen de 300 L.
  - ii. Utilizando la bomba de succión en el primer piso de la planta, succionar del tonel la cantidad de solución preparada y bombearla al tanque 1.
  - iii. Recircular la solución en el tanque 1 por 15 min.
  - iv. Transferir al tanque 2 la solución recirculada y realizar las operaciones de recirculación por 15 min.
- c. **Acción mecánica:**
  - i. Transferir hacia los molinos 1 y 2 la solución para limpieza interna de los molinos. Encender los molinos y transferir la solución en partes iguales hacia los tanques 3 y 4 y drenar.
  - ii. Preparar 300 L adicionales de solución al 3 % de detergente y lavar las paredes de los tanques 3 y 4. Usar parte de esta solución (100 L) para lavar distribuidor de líneas y bomba de recirculación.
  - iii. Transferir a molino 3 y dejar actuar por 15 minutos
  - iv. Utilizar el resto de solución al 3 % de detergente para lavar las paredes del mezclador de goma Xantana 1 (tanque B1).
  - v. Drenar todo el sistema. Después de 10 min de dejar actuar la solución al interior de las tuberías hacia las líneas de empaque.
- d. **Enjuague con agua:**

- i. Con una manguera con agua o hidrolavadora, retire toda la suciedad y el exceso de detergente de la superficie de los tanques con agua, usando los mismos pasos anteriores para cada tanque y equipos (incluido el desespumador).

**e. Desinfección:**

- i. Preparar 300 L de solución de desinfectante.
- ii. Dejar correr la solución preparada por el sistema (tanque 1, 2 3 y 4 y molinos 1, 2 y 3.
- iii. Preparar 100 L adicionales de solución de desinfectante ES al 0.2 %. Luego, lavar con esta las paredes del tanque B1 y drenar todo el sistema. No es necesario enjuagar con agua luego de utilizar el desinfectante.

### 3. Metodología de limpieza y desinfección de envasadora

#### Materiales para envasadora:

- Detergente al 3 % (0.03 cc de detergente por cada litro de agua)
- Solución de desinfectante ES al 0,06 % V/V (0,6 mililitros de desinfectante puro por cada litro de agua)
- Equipo de protección personal.

#### Procedimiento para limpieza y desinfección de envasadora:

- a. **Instalación de Mangueras y Tubos:** Para comenzar el proceso de limpieza, instalar las mangueras de lavado y los tubos de los cilindros.
- b. **Enjuague con Agua:**
  - i. Humedecer las superficies a lavar, como tuberías, depósitos, cilindros, mangueras y boquillas, con agua. Distribuir 100 L de agua en todos los equipos.
- c. **Limpieza con Detergente:**
  - i. Preparar 200 L de la solución detergente al 3 % (0.03 cc de detergente por cada litro de agua) en un IBC o tonel previamente limpio.
  - ii. Utilizar la bomba de succión para succionar del IBC o tonel toda la solución preparada y bombearla por todo el proceso.
  - iii. Drenar alrededor de la mitad de la solución. Luego abrir el depósito superior y lavar sus paredes manualmente con una esponja o trapo limpio.
  - iv. Drenar el resto de la solución.
  - v. Enjuagar con agua todo el sistema para eliminar el resto de solución. (Se debe utilizar la misma cantidad de agua que de la solución).
- d. **Desinfección con desinfectante:**
  - i. Preparar en un IBC o tonel previamente limpio 200 L de solución de desinfectante al 0,06 % V/V (0,6 mililitros de desinfectante ES puro por cada litro de agua). A continuación, se detalla la cantidad de agua y desinfectante que se utilizará para cada línea de envasado:
  - ii. Utilizar la bomba para succionar del IBC toda la solución preparada y bombearla al depósito superior (caja).

- iii. Drenar alrededor de la mitad de la solución. Luego abrir el depósito superior y lavar sus paredes manualmente con una esponja o trapo limpio. Nota: Utilizar guantes.
- iv. Drenar el resto de la solución.

#### **4. Metodología para detección de microorganismos en muestras de agua y producto semiterminado y terminado**

##### Materiales y Equipos:

- Láminas de inmersión (dip slides) marca Merck
- Muestra a analizar
- Agua peptonada esterilizada
- Frasco estéril (de 100 mL o más)
- Incubadora ajustable a 27 °C
- Pipetas estériles
- Agitador (opcional)

##### Procedimiento:

###### **1. Preparar la Muestra:**

- a. Tomar 10 mL de la muestra que se desea analizar. Asegurarse de que la muestra esté bien mezclada para obtener una representación precisa.

###### **2. Preparar la Solución Diluyente:**

- a. Diluir la muestra en una solución de agua peptonada esterilizada. Para ello, añadir los 10 mL de muestra a 90 mL de agua peptonada esterilizada en un frasco estéril. Esto proporciona una dilución adecuada y un ambiente estéril para la incubación.

###### **3. Sumergir la lámina:**

- a. Introducir la lámina de inmersión (dip slide) en el frasco que contiene la muestra diluida. Asegurarse de que la superficie de la lámina esté completamente sumergida en la solución para asegurar un contacto homogéneo.
- b. Sacar la lámina y colocarla nuevamente en su frasco original

###### **4. Incubar la Muestra:**

- a. Colocar el frasco original con la lámina de inmersión en una incubadora ajustada a 27 °C. Incubar la muestra durante 48 horas. La incubación permite que los microorganismos presentes en la muestra crezcan en la superficie de la lámina.

###### **5. Evaluar los Resultados:**

- a. Después de 48 horas de incubación, retirar la lámina de inmersión del frasco y examinar los resultados.

**Notas Adicionales:**

- Asegurarse de que todo el equipo esté esterilizado para evitar contaminaciones cruzadas.
- Si se desea cuantificar la cantidad de microorganismos, seguir las instrucciones específicas del fabricante de las láminas de inmersión para asegurar resultados precisos y confiables

**5. Metodología para hisopado de superficies**

Materiales:

- MVP ICON®, luminómetro para detección de residuos orgánicos
- Hisopos (MVP ICON Surface Sampling Device)

Procedimiento:

1. Tomar el hisopo para análisis de superficies



**Figura 23.** Hisopo para BioControl MVP Icon

**Nota.** Fuente propia

2. Quitar tapadera de hisopo
3. Raspar la superficie con el hisopo en un área de 10X10 cm en los puntos críticos.
4. Colocar nuevamente la tapadera del hisopo

5. Activar el hisopo, ejerciendo presión en la parte superior del hisopo.



**Figura 24** .Activación del hisopo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida

**Nota.** Fuente propia

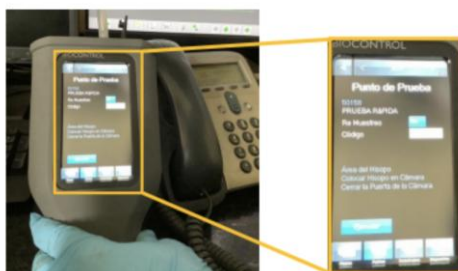
6. Insertar el hisopo activado en el equipo de medición



**Figura 25.** Inserción del hisopo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida

**Nota.** Fuente propia

7. Seleccionar prueba rápida en el programa



**Figura 26.** Prueba rápida. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida

**Nota.** Fuente propia

8. Revisar resultado en URL y anotar en protocolo de control de limpieza

## **6. Metodología para cuantificación de cloro en muestras de agua**

### Materiales:

- Kit de análisis Spectroquant® para hipoclorito de sodio
- Espectrofotómetro: compatible con los viales de Spectroquant®.
- Viales de reacción Spectroquant®:
- Tubos con los reactivos previamente dispuestos para la reacción colorimétrica.
- Muestra de agua

### Metodología:

#### **1. Preparación de la muestra:**

- a. Se toma una de 10 alícuota de la muestra de agua a analizar y se agrega a un vial vacío.
- b. Adición de reactivo: Según el tipo de cloro que se desea cuantificar (cloro libre o cloro total), se agrega el reactivo específico del kit Spectroquant® al vial que contiene la muestra.
- c. Para cloro libre:
  - i. Se toma el vial del kit que contiene el reactivo DPD (N,N-dietil-p-fenilendiamina) en estado sólido o en una solución premezclada.
  - ii. A la muestra de agua, se añade el reactivo DPD. Se agregar según la cantidad especificada por proveedor.
  - iii. Se tapa el vial y se agita ligeramente para homogeneizar.
  - iv. El color rosado que se forma es proporcional a la cantidad de cloro libre en la muestra.
- d. Para cloro total, se añaden reactivos adicionales para liberar el cloro combinado antes de la medición.
  - i. A continuación, se añade el reactivo adicional, yoduro de potasio. Se agregar según la cantidad especificada por proveedor.
  - ii. Se agita la mezcla y se deja que reaccione durante aproximadamente 2-5 minutos.
  - iii. El color rosado que se forma ahora incluye la contribución del cloro libre y combinado, lo que refleja la concentración total de cloro.

**2. Medición espectrofotométrica:**

- a. Después del tiempo de reacción, el vial se inserta en el espectrofotómetro, que mide la absorbancia a una longitud de onda específica.
- b. El espectrofotómetro traduce esta absorbancia en concentración de cloro mediante una curva de calibración preestablecida.

**3. Interpretación de resultados:**

- a. Los resultados se muestran directamente en el espectrofotómetro en mg/L o ppm de cloro.

## H. Datos de placa de equipos

**Cuadro 25.** Luminómetro

<b>Agencia</b>	EP ISO USP
<b>Fabricante</b>	MVP ICON®
<b>Método de análisis</b>	Bioluminiscencia del ATP
<b>Información legal</b>	BioControl es una marca registrada de BioControl Systems, Inc. MVP ICON es una marca registrada de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania

**Cuadro 26.** Dispositivo de muestreo de superficie MVP ICON® (Hisopos)

<b>Nivel de calidad</b>	200
<b>Fabricante</b>	MVP ICON®
<b>Condiciones de almacenamiento</b>	Temperatura ambiente (2-30 °C)
<b>Aplicaciones</b>	alimentos y bebidas, seguimiento de personal (monitoreo), monitoreo de superficie
<b>Compatibilidad</b>	Para usar con el instrumento MVP ICON
<b>Método de medición</b>	Bioluminiscencia del ATP

**Cuadro 27.** Spectroquant

<b>Nombre del producto</b>	Prove 600, suitable for UV/VIS spectroscopy, Spectroquant®
<b>Línea del producto</b>	Spectroquant®
<b>Nivel de calidad</b>	100
<b>Técnicas</b>	Espectroscopía UV/Vis: adecuada Fotometría: adecuada
<b>Temperatura de almacenamiento</b>	Temperatura ambiente

**Cuadro 28.** Incubadora

<b>Fabricante</b>	LAB-LINE INSTRUMENTS, INC.
<b>Modelo</b>	Imperial III No. 310
<b>No. de serie</b>	0599-0437
<b>Voltaje</b>	120
<b>Hertz</b>	50/60
<b>Rango de temperatura</b>	Ligeramente por encima de la temperatura ambiente hasta 65 °C

**Cuadro 29.** Campana de flujo laminar

<b>Fabricante</b>	SerProma
<b>Modelo</b>	CFLH600
<b>Serie</b>	23-23
<b>Voltaje</b>	150
<b>Amp</b>	4
<b>Método de acción</b>	Luz UV

### **XIII. Glosario**

- **URL (Unidades relativas de luz):** Medida utilizada para cuantificar la intensidad de luz en comparación con un valor de referencia estándar. Se emplea en fotometría para describir la cantidad de luz emitida o reflejada en un entorno determinado.
- **UFC (Unidades Formadoras de Colonias):** Unidad empleada en microbiología para estimar el número de microorganismos viables en una muestra. Cada unidad representa una colonia visible que se forma cuando un microorganismo se reproduce en condiciones adecuadas, indicando la presencia y concentración de microorganismos vivos en la muestra.
- **IBC (Intermediate Bulk Container):** Contenedor de gran capacidad utilizado para almacenar y transportar líquidos o materiales a granel. Generalmente tiene una capacidad de 1000 litros (no 100 litros), aunque existen tamaños más pequeños. Está diseñado para ser resistente, reutilizable y fácil de manipular, siendo ampliamente utilizado en la industria química y alimentaria.

## XIV. Anexos

### A. Fotografías



**Figura 27.** Muestra 1 agua de cisterna. El color rosado indica presencia de cloro en el agua. Lugar: laboratorio de empresa productora de fungicida

**Nota.** Fuente propia



**Figura 28.** Muestra 1 de tanque de almacenamiento de agua tratada. La falta de color indica la ausencia de cloro en el agua. Lugar: laboratorio de empresa productora de fungicida



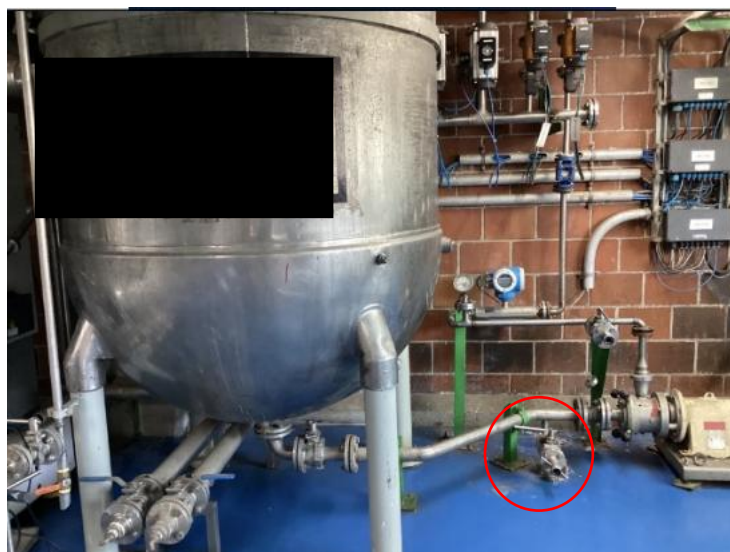
**Figura 29.** Tanque B1. Preparación de goma xantana, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida

**Nota.** Fuente propia



**Figura 30.** Tolva de descarga de sólidos de tanque B1, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida

**Nota.** Fuente propia



**Figura 31.** Válvula V9 a la salida de tanque B1, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida

**Nota.** Fuente propia



**Figura 32.** Bomba de succión en primer piso de planta, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida

**Nota.** Fuente propia



**Figura 33.** Válvula V1, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida

**Nota.** Fuente propia



**Figura 34.** Válvula V3, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida

**Nota.** Fuente propia





**Figura 37.** Tanque A1, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida

**Nota.** Fuente propia



**Figura 38.** Tanque A2, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida

**Nota.** Fuente propia



**Figura 39.** Tanque A3, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida

**Nota.** Fuente propia



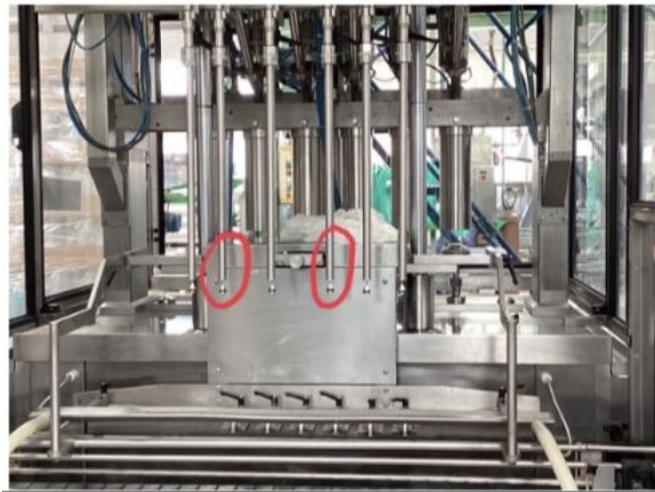
**Figura 40.** Tanque A4, punto de muestreo. Lugar: área de formulación de empresa productora de fungicida

**Nota.** Fuente propia



**Figura 41:** cilindros de envasadora, punto de muestreo. Lugar: área de envasado de empresa productora de fungicida

**Nota.** Fuente propia



**Figura 42.** boquillas de envasadora, punto de muestreo. Lugar: área de envasado de empresa productora de fungicida

**Nota.** Fuente propia



**Figura 43.** manguera de envasadora, punto de muestreo

**Nota.** Fuente propia



**Figura 44.** Tubería 1 hacia envasadora, punto de muestreo

**Nota.** Fuente propia



**Figura 45.** Depósito superior de envasadora, punto de muestreo