

# Efecto bactericida de la cal hidratada en solución acuosa

Carlos Muñoz Ruiz,<sup>1</sup> Arturo Collazo Ponce<sup>2</sup>  
y Francisco J. Alvarado<sup>3</sup>

Se determinó el efecto bactericida de los sobrenadantes de las soluciones saturadas de cal común y de hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) micronizado (1500 mg/L), que se usó a manera de testigo, comparándolo con el de los desinfectantes constituidos por soluciones de plata coloidal al 0,33% (0,0016 mg/L), sulfacloramina de tolueno (41 mg/L) con bicarbonato de sodio (9 mg/L) e hipoclorito de sodio (5 mg/L). Para ello se emplearon cuatro cepas de *Vibrio cholerae* No. 01, *V. parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Sh. sonnei* y *Sa. enteritidis*. Estas bacterias se usaron para inocular las sustancias bactericidas ya citadas y, después de distintos tiempos de incubación, las bacterias sobrevivientes se cuantificaron in vitro por medio de la técnica de vaciado en placa. El resultado se expresó en unidades formadoras de colonias (UFC).

Se estimó in situ la carga de *V. cholerae* soltada por 35 fresas y 35 rábanos (con un peso aproximado de 10 g por unidad) al lavarlos bajo un chorro de agua potable, sumergirlos en el sobrenadante de una solución saturada de cal (1,5 g/L), y ambas cosas.

El mayor efecto bactericida se obtuvo con *V. cholerae* 01 y se observó a los 3 minutos. Otras enterobacterias resistieron el efecto bactericida hasta 30 minutos.

El *Vibrio cholerae* 01, que es el agente causal del cólera, se ha venido diseminando por todo el mundo desde 1961, fenómeno que se ha denominado la séptima pandemia. En América Latina, la población de Chancay en el Perú fue la primera en ser afectada por este microorganismo. En diciembre de 1993 ya se habían notificado 951 820 casos en el mundo, con tasas de mortalidad variables y de alrededor de 1% en promedio. Las poblaciones afectadas suelen tener una infraestructura sanitaria deficiente, razón por la cual la transmisión secundaria es más común. El agua y los alimentos contaminados son los vehículos de esta propagación (1).

El uso de la cal como bactericida es parte del acervo cultural tradicional de todos los pueblos. La cal se usa en labores de tenería, en el tratamiento de árboles invadidos por microorganismos y en el control de la fermentación posmórtem de animales y otras materias orgánicas. No obstante, actualmente el uso del hidróxido de calcio como bactericida en el campo de la salud pública sigue siendo empírico, salvo en el caso de la odontología, disciplina en la cual se introdujo en 1920 (2). Varios estudios científicos se han realizado con hidróxido de calcio en pasta (3, 4) y en solución acuosa (5) para determinar su eficacia contra microorganismos anaerobios, como *Streptococcus mutans*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

Nuestro trabajo tuvo por objeto 1) determinar la utilidad bactericida del sobrenadante cuando se satura el agua con cal de construcción hidratada a razón de 1,5 g/L (lográndose un pH de 12,3), y 2) comparar dicha utilidad con la de otros desinfectantes de uso común. Para poner a prueba su eficacia

<sup>1</sup> Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Jiquilpán, Michoacán, México.

<sup>2</sup> Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, México, D.F., México.

<sup>3</sup> Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, México, D.F., México. Toda correspondencia debe dirigirse a este autor a la siguiente dirección postal: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Carpio No. 470, Colonia Santo Tomás, México 11340 D.F., México.

*in vivo* con frutas y verduras también se utilizaron fresas y rábanos, que crecen en contacto con suelos regados con agua no potable.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las siguientes cepas bacterianas fueron obtenidas del banco de cepas del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), en México, D.F.: *Vibrio cholerae* 01 clásico Inaba, *V. cholerae* 01 El Tor Ogawa, *V. cholerae* 01 El Tor Inaba, *V. parahaemolyticus* No 01, *Escherichia coli* 0:116, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Sh. sonnei* y *Sa typhimurium*. Se obtuvo, además, una cepa de *V. cholerae* 01 El Tor Ogawa de los Centros para la Prevención y el Control de Enfermedades (CDC) en Atlanta, Georgia, Estados Unidos de América.

Para comparar el efecto bactericida *in vitro* del sobrenadante de soluciones saturadas de cal común y de hidróxido de calcio micronizado contra distintos serotipos de *V. cholerae* 01 con el de otros desinfectantes, se utilizaron algunos de los productos disponibles en el mercado a las dosis y tiempos recomendados por los fabricantes.

Tres productos fueron examinados: 1) solución de plata coloidal al 0,33% (0,0016 mg/L); 2) sulfacloramina de tolueno con bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) a razón de 41 y 9 mg/L, respectivamente, en comprimidos; y 3) hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) a razón de 5 partes por millón (5 mg/L). El efecto de estos productos se comparó con el de los sobrenadantes de soluciones saturadas de cal hidratada (marca Bertrán) y de hidróxido de calcio micronizado, que es la forma que se encuentra libre de impurezas porque se capta en mallas de menos de 20 micras durante el proceso de elaboración de la cal común.

### Pruebas de actividad bactericida *in vitro*

Las cepas de *V. cholerae* y de otras bacterias coliformes se incubaron 24 horas a 36,5 °C en caldo peptonado alcalino y caldo peptonado con un pH de 7,0, respectiva-

mente —ambos caldos se sembraron con un 0,01 mL de inóculo bacteriano—, y se cosecharon en fase de crecimiento exponencial. Una vez ajustada su concentración a la recomendada por los fabricantes, los bactericidas comerciales a base de plata coloidal, sulfacloramina de tolueno con bicarbonato de sodio, e hipoclorito de sodio fueron inoculados con 1,0 mL de cada caldo bacteriano, cuya concentración bacteriana era del orden de  $10^9$ . En el caso de la cal hidratada y del hidróxido de calcio micronizado, el inóculo se añadió a 1,0 mL de sobrenadante de la solución saturada (1,5 g/L), cuyo pH varió de 12,3 a 12,74. Una vez inoculadas todas las sustancias con los caldos bacterianos, se tomaron muestras de cada mezcla para calcular el número de unidades formadoras de colonias (UFC) a temperatura ambiente después de diferentes tiempos de exposición al desinfectante, que fueron de 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. Estas muestras se fueron diluyendo por potencias de 10 en caldo peptonado o en amortiguador de fosfatos con un pH de 8,0 con el propósito de inactivar los desinfectantes y cuantificar las concentraciones bacterianas. La cuantificación de los microorganismos sobrevivientes se efectuó vaciando 1,0 mL de cada mezcla (con una concentración aproximada de  $1 \times 10^9$  UFC por mL) en una placa con medio de cultivo a base de agar soya con tripticasa (AST, de marca Becton-Dickinson) (6). Al cabo de 24 a 48 horas a 37 °C se contaron las UFC en cada placa. A estas muestras también se les hizo un recuento directo de UFC mediante vaciado en placa, sin exposición a los desinfectantes, para usarlas a manera de testigos.

### Pruebas de actividad bactericida *in vivo*

Para estimar *in vivo* la eficacia bactericida del sobrenadante de una solución saturada de cal común en presencia de *V. cholerae*, 35 fresas y 35 rábanos, con un peso aproximado de 10 g por unidad, se sumergieron en dichas sustancias y se incubaron a temperatura ambiente tras la inoculación de cada hortaliza con 0,01 mL de *V. cholerae* 01 El Tor Ogawa

aplicado con un asa calibrada. La dosis inoculada fue el equivalente de 4 a  $8 \times 10^2$  UFC por gramo de vegetal.

Después de 30 minutos de incubación, durante los cuales los microorganismos se adhieren a la superficie, los rábanos y fresas se dividieron en tres grupos de 10 piezas cada uno. El primer grupo se colocó en un colador bajo un chorro de agua potable por 10 minutos en movimiento constante, agitándose vigorosamente con una mano enguantada. El segundo grupo se trató de la misma manera pero también se sumergió en una solución saturada de cal hidratada por 30 minutos después del lavado. El tercer grupo solo se sumergió en la solución saturada de cal común por 30 minutos. Posteriormente se cuantificó por separado la carga bacteriana que sobrevivió en cada grupo al cabo de los diversos tratamientos. Las lecturas se hicieron por duplicado y se tomó el promedio.

Se usaron a manera de testigos cinco fresas y cinco rábanos, que se fueron retirando uno por uno y colocando individualmente en frascos con 90 mL de diluyente a base de agua peptonada (1 g/L) hasta conseguir un peso total de 100 g. Los frascos se agitaron, como exige la técnica original, y la carga bacteriana desprendida se estimó por recuento de UFC mediante la técnica usada para cuantificar coliformes en legumbres. Esta consistió en diluir progresivamente el sobrenadante de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ , por potencias de 10, y transferir 1,0 mL de cada solución a cajas de petri estériles por duplicado, agregándole posteriormente a cada una 15,0 mL de medio AST e incubándola de 24 a 48 horas (7).

## RESULTADOS

Los experimentos in vitro muestran que las poblaciones iniciales de *V. cholerae* clásico Inaba, El Tor Ogawa y El Tor Inaba, y las de *V. parahaemolyticus* no 01, que variaron de  $3,6 \times 10^8$  a  $8,0 \times 10^8$  UFC, fueron eliminadas tras una exposición de menos de 1 minuto a los sobrenadantes de las soluciones acuosas saturadas de cal común y micronizada. Este tiempo no es suficiente para poder trazar una curva poblacional, de manera que en el cuadro 1 solo se presentan los resultados con *E. coli*, *Sa. typhimurium*, *Sh. flexneri*, *Sh. sonnei* y *Sa. enteritidis* enteropatógenos. Como se indica en el cuadro, se necesitó un tiempo de exposición a las sustancias bactericidas de alrededor de 30 minutos para que las UFC de estos microorganismos desaparecieran de las placas.

La actividad de los bactericidas comerciales también se presenta en el cuadro 1. Cuando se inocularon con las muestras de microorganismos que sirvieron de testigos, las soluciones de plata coloidal y sulfacloramina de tolueno no eliminaron totalmente las bacterias, ni siquiera al cabo de 1 hora. El hipoclorito de sodio disminuyó notablemente la carga bacteriana, pero no la pudo eliminar por completo en 10 minutos.

Los experimentos in situ indican que las cargas bacterianas adheridas a la superficie de los rábanos y fresas se eliminan más eficazmente con el tratamiento combinado de lavado bajo un chorro de agua más inmersión por 30 minutos en un sobrenadante de solución saturada de cal común, como se aprecia

**CUADRO 1. Actividad bactericida de distintos desinfectantes en presencia de *V. cholerae* 01 biotipo El Tor, serotipo Ogawa**

Desinfectante	Tiempo (en minutos)	UFC* (recorridos)
Plata coloidal al 0,33% (0,0016 mg/L)	60	$6,8 \times 10^8 - 4,6 \times 10^9$
Sulfacloramina de tolueno (50 mg/L)	60	$6 \times 10^6 - 7,1 \times 10^9$
Hipoclorito de sodio (5 mg/L)	10	$6,4 \times 10^3 - 3,7 \times 10^6$
Sobrenadante de hidróxido de calcio micronizado (1500 mg/L)	1	0
Sobrenadante de cal hidratada (1500 mg/L)	1	0
Muestra testigo	60	$5,3 \times 10^8 - 6,2 \times 10^9$

\* Unidades formadoras de colonias.

**CUADRO 2. Estimación de la carga bacteriana in situ en la superficie de rábanos y fresas después de lavarlos bajo un chorro de agua, sumergirlos en el sobrenadante de una solución de cal saturada, y de ambas cosas**

Tratamiento	UFC*	
	Fresas	Rábanos
Ninguno (muestras testigo)	471,0	731,60
Chorro de agua	5,3	9,05
Inmersión en sobrenadante de solución de cal saturada por 30 min.	8,6	16,45
Chorro de agua más inmersión en sobrenadante de solución de cal saturada por 30 min.	5,1	2,70

\* Número promedio de unidades formadoras de colonias por gramo de rábanos o fresas.

en el cuadro 2. La diferencia fue significativa, con una  $t$  de Student =  $P < 5,0$ , incluso cuando se aplicó solo el lavado bajo un chorro de agua potable, sobre todo a los rábanos.

## DISCUSIÓN

Este estudio muestra claramente que los sobrenadantes de las soluciones saturadas de hidróxido de calcio micronizado y de cal de construcción son excelentes sustancias bactericidas, especialmente en presencia de las diferentes especies de *V. cholerae*. Indica, además, que la actividad de la solución acuosa saturada se manifiesta no solo cuando se usan bacterias que han estado almacenadas en bancos de cepas, sino también cuando las cepas están recién aisladas.

El mecanismo de acción del sobrenadante del hidróxido de calcio en solución acuosa saturada aparentemente se produce en la membrana externa bacteriana, ya que hemos observado la incorporación de yoduro de propidio en el ADN con citómetro de flujo a rayo láser (8). El hipoclorito de sodio a una concentración de 5 partes por millón (5 mg/L), que es la máxima concentración permisible para el agua potable de uso doméstico, logró reducir las poblaciones bacterianas, pero no con la misma eficacia y rapidez que los agentes alcalinos mencionados. El hipoclorito de sodio en aguas contaminadas a concentraciones de 25 y 50 partes por millón (datos no presentados) no se recomienda por el

efecto carcinógeno de las nitrosaminas producidas cuando este entra en contacto con materias orgánicas (9, 10). La plata coloidal y la sulfacioramina de tolueno disminuyeron aun menos la viabilidad bacteriana.

Aunque no se ha notificado que los rábanos y las fresas sean vehículos de *V. cholerae* 01, en el campo los coliformes fecales se aíslan de ellos con frecuencia (11). Nuestros datos indican que para reducir la carga bacteriana no basta con la inmersión en el sobrenadante de soluciones saturadas de hidróxido de calcio micronizado o cal de construcción, y que un buen lavado previo ayuda a desprender los microorganismos. Sin embargo, en la gran mayoría de las comunidades rurales no hay agua potable, por lo que se sugiere usar solo la inmersión en el sobrenadante de agua saturada con cal. Para fines prácticos, una cucharadita de cal para 1 L de agua es suficiente para obtener un pH de 12,3 sin riesgo de toxicidad, ya que en ratas la dosis oral promedio con efecto letal es de 7,34 g/K (12). Además, el hidróxido de calcio es poco soluble en agua, ya que su índice de solubilidad es de 165 mg/L (13).

Sobre la base de los resultados expuestos en este trabajo se recomienda que el sobrenadante de una solución saturada de cal se introduzca como agente desinfectante en zonas donde el cólera es endémico. La cal común no es un compuesto ajeno a la dieta de México y Centroamérica, puesto que se usa en la "nixtamalización" o hidrólisis térmica alcalina del maíz para elaborar tortillas. En las tortillas el sabor de la cal es imperceptible y lo mismo sucede cuando se desinfectan las frutas y legumbres. La cal común se utiliza también como agente floculante en aguas con partículas sólidas en suspensión y en esta forma puede incluso beberse. Esta práctica se remonta a épocas prehispánicas y perdura en ciertas comunidades.

## CONCLUSIONES

- 1) El sobrenadante de la cal de construcción en solución acuosa saturada inactiva *V. cholerae* 01 in vitro en menos de 1 minuto, a diferencia de otras bacterias enteropa-

tógenas, las cuales tienen que someterse a una exposición de hasta 30 minutos para ser inactivadas.

- 2) El empleo del sobrenadante de cal en solución acuosa saturada para desinfectar verduras y frutas que crecen en contacto con el suelo, como los rábanos y las fresas, se recomienda en zonas donde no hay agua potable. El sobrenadante puede usarse tanto para un lavado previo como para la inmersión durante 30 minutos.

## REFERENCIAS

1. Kumate J, Sepúlveda J y Gutiérrez G. *El cólera: epidemias, endemias y pandemias*. México, D.F.: Interamericana, McGraw-Hill; 1993.
2. Leonardo MR, Leal JM y Simoes AP. *Endodoncia: tratamiento de los conductos radiculares*. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1983.
3. Ferreira AC, Almeida D, Fonseca GA. Evaluation of the bacteriostatic and bactericidal power of calcium hydroxide, as a dressing in root canals: in vitro and in vivo studies. *Rev Bras Odontol* 1978;35: 15-21.
4. Gencoglu N, Kulekci G. Antibacterial efficacy of root canal medicaments. *J Nihon Univ Sch Dent* 1992;34:233-236.
5. Alcam T, Omurlu H, Ozkul A, Gorgul G, Misirligil A. Cytotoxicity versus antibacterial activity of some antiseptics in vitro. *J Nihon Univ Sch Dent* 1993;35:22-27.
6. Speck ML. *Compendium of methods for the microbiological examination of food*. 2a. ed. Washington, D.C.: American Public Health Association; 1984.
7. Power AP, McCuen PJ. *Manual of BBL products and laboratory procedures*. 6a. ed. Cockeysville, Maryland: Becton-Dickinson Microbiology Systems; 1988.
8. Muñoz RC, Collazo PA, Preciado GH, Soto PC, Valdespino GJL, Alvarado AFJ. Efecto bactericida del hidróxido de calcio micronizado sobre *Vibrio cholerae* O1 valorado por microcitometría de flujo. Guadalajara, México: Asociación Mexicana de Microbiología. Informe presentado en el XXIV Congreso Nacional de Microbiología, marzo de 1993. (Resumen M-2).
9. Hayatsu H, Hoshino H, Kawazoe Y. Potential cocarcinogenicity of sodium hypochlorite. *Nature* 1971;233:495.
10. Castegnaro M, Brouet I, Michelon J, Lunn G, Sansone EB. Oxidative destruction of hydrazines produces n-nitrosamines and other mutagenic species. *Am Ind Hyg Assoc J* 1986;47:370-374.
11. Muñoz RC, Collazo PA, Alvarado FJ. Efecto bactericida de la cal común en solución acuosa saturada versus *Vibrio cholerae* adherido a fresas y rábanos. *Enf Infecc Microbiol* 1993;13:366(Resumen 38).
12. M. Windholz Ed. *The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. 9a. ed. Rahway, NJ: Merck & Co., Inc.; 1976.
13. Nalco Chemical Company. *Nalco water handbook*. México, D.F.: McGraw Hill; 1989.

## ABSTRACT

### Bactericidal Effect of Hydrated Lime in Aqueous Solution

This study determined the bactericidal effect of the supernatants of saturated solutions of common lime and of micronized calcium hydroxide (Ca(OH)<sub>2</sub>) (1500 mg/L), which was used as a control, compared with disinfectants made of solutions of 0.33% colloidal silver (0.0016 mg/L), toluene sulfachloramine (41 mg/L) with sodium bicarbonate (9 mg/L), and sodium hypochlorite (5 mg/L). The test involved four strains of *Vibrio cholerae* O1, *V. parahemolyticus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flex-*

*neri*, *Sh. sonnei*, and *Sa. enteritidis*. These bacteria were inoculated into the bactericidal substances listed above and, after different incubation times, the number of surviving bacteria was determined in vitro by using a counting plate. The results were expressed in colony-forming units (CFU).

An in situ estimate was made of the amount of *V. cholerae* on 35 strawberries and 35 radishes (having a weight of about 10 g per unit) after they were washed under a flow of potable water, submerged in the supernatant of the saturated lime solution (1.5 g/L), or both.

The greatest bactericidal effect was obtained against *V. cholerae* O1 and was observed in 3 minutes. Other enterobacteria were resistant to the effect for up to 30 minutes.