



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“EVALUACIÓN DEL USO DE
RADIACIÓN UVC PARA LA
ELIMINACIÓN DE
MICROORGANISMOS MESÓFILOS Y
EL EFECTO EN LA ESTRUCTURA DE
FRAGMENTOS DE MASCARILLAS
KN95”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

MARLON MIGUEL MORALES MOISELA

LIMA – PERÚ

2023

ASESOR

Dra. Jasmin Hurtado Custodio

CO-ASESOR

Dra. Fanny Lys Casado Peña

JURADO DE TESIS

DRA. PATRICIA SHEEN CORTAVARRIA
PRESIDENTE

DR. HOLGER MAITA MALPARTIDA
VOCAL

MG. RUTH LILIANA CRISTOBAL DELGADO
SECRETARIO (A)

DEDICATORIA

A mi madre Mónica Moiséla y a mi padre, que en paz descansa, Miguel Morales.

Por su convicción y creer en mí como profesional y como ser humano.

A mi familia por su apoyo incondicional y constantes ánimos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi familia y amigos por su constante apoyo en mi carrera profesional, sus ánimos para continuar en el largo camino de la ciencia y su cariño en cada uno de mis logros, en especial, a mi madre Mónica Moiséla y mi padre Miguel Morales sin quienes no habría logrado mi formación profesional y personal.

A mis asesoras, la Dra. Fanny Casado de la Pontificia Universidad Católica del Perú, por permitirme utilizar las instalaciones del Instituto de Ciencias Ómicas y Biotecnología Aplicada (ICOBA) para la realización de este presente trabajo de tesis, así como su constante apoyo, seguimiento, asesoría y mentoría en este tiempo de trabajo. Asimismo, a la Dra. Jasmin Hurtado de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por su dedicación en la revisión y asesoría del presente trabajo y su papel como asesora representante de la casa de estudios.

Finalmente, a todos aquellos profesionales, colegas y amigos que de alguna manera contribuyeron en el desarrollo de este trabajo de tesis.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Tesis autofinanciada

EVALUACIÓN DEL USO DE RADIACIÓN UVC PARA LA ELIMINACIÓN DE MICROORGANISMOS MESÓFILOS Y EL EFECTO EN LA ESTRUCTURA DE FRAGMENTOS DE MASCARILLAS KN95

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	Augustin Charvet, Nathalie Bardin-Monnier, Dominique Thomas, Olivier Dufaud et al. "Impact of washing cycles on the performances of face masks", Journal of Aerosol Science, 2021 Publicación	1%
2	link.springer.com Fuente de Internet	1%
3	www.mdpi.com Fuente de Internet	1%
4	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	1%
5	www.frontiersin.org Fuente de Internet	1%
6	Submitted to University of Leeds Trabajo del estudiante	1%

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN
ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	ANTECEDENTES.....	3
III.	HIPÓTESIS.....	9
IV.	OBJETIVOS.....	10
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
VI.	RESULTADOS.....	20
VII.	DISCUSIÓN.....	27
VIII.	CONCLUSIONES.....	32
IX.	RECOMENDACIONES.....	33
X.	REFERENCIAS.....	34
XI.	ANEXOS	

RESUMEN

Introducción. El contexto de la pandemia por COVID-19 ha aumentado el uso de elementos de protección personal en profesionales de la salud. El uso constante de mascarillas ha aumentado su escasez en instituciones hospitalarias, lo que genera un uso prolongado de la mascarilla incrementando el riesgo de contaminación del EPP, por consiguiente, se vuelve imperativa la necesidad de buscar metodologías que permitan prolongar el tiempo de vida de las mascarillas mediante su desinfección pero preservando su eficacia. **Objetivo.** Evaluar el uso de radiación UVC en la reducción de microorganismos mesófilos y el efecto en la estructura de fragmentos de mascarillas KN95. **Metodología.** Se realizó la inoculación de segmentos de mascarilla KN95 con tres cepas bacterianas certificadas que incluyen *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y dos cepas certificadas productoras de esporas que incluyen a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Posteriormente, los segmentos fueron expuestos a radiación UVC con lámparas de similares características de intensidad de luz, manteniendo una distancia constante en intervalos de tiempo de 1.5, 2, 5 y 10 minutos. A continuación, se determinó la reducción logarítmica de la desinfección por radiación. Finalmente, se evaluó el efecto de la radiación UVC en la estructura externa de las mascarillas KN95 usando microscopía electrónica de barrido. **Resultados.** Se observó una reducción significativa del crecimiento microbiano (99%) a partir de los 2 minutos de exposición a radiación UVC con más de 1 Log. A su vez, se presentaron efectos dañinos a la estructura de la mascarilla a partir de los 5 minutos de exposición a radiación UVC.

Conclusiones. Se concluye que el tiempo de exposición óptimo de los fragmentos de mascarillas KN95 a radiación UVC es de 2 minutos, debido a que se demuestra una reducción significativa de la carga microbiana y se mantiene estable la estructura de las fibras de las mascarillas.

Palabras clave: Radiación UVC, mascarillas KN95, Eficacia, Acción germicida.

ABSTRACT

Introduction. The context of COVID-19 pandemics has increased the use of personal protection elements in health professionals. The constant use of masks has increased the shortages in hospitals, which generates a long-term used or reuse of face masks increasing risk of its contamination, therefore, the need to seek methodologies that allow prolonging the time of life of the masks through their disinfection and effectiveness becomes imperative. **Objective.** Evaluate the use of UVC radiation in the reduction of mesophilic microorganisms and effects in the structure of KN95 masks fragments. **Methodology.** KN95 masks' segments were inoculated with three certified bacterial strains including *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and two spores of certified strains including *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Subsequently, the segments were exposed to UVC radiation with lamps of similar light intensity characteristics, maintaining a constant distance at time intervals of 1.5, 2, 5 and 10 minutes. Next, the log reduction of radiation disinfection was determined. Finally, the effect of UVC radiation on the external structure of the KN95 masks was evaluated using scanning electron microscopy. **Results.** A significant reduction in microbial growth (99%) was observed after 2 minutes of exposure to UVC radiation with more than 1 Log. In turn, there were damaging effects to the structure of the mask after 5 minutes of exposure to UVC radiation, demonstrated by the presence of melting fibers and obstructions. **Conclusions.** It is concluded that the optimal exposure time of the KN95 masks fragments to UVC radiation is 2 minutes, since a significant reduction

in the microbial load is demonstrated and the structure of the mask fibers remains stable.

Keywords: UVC radiation, KN95 masks, filtration efficiency, germicidal action.

I. INTRODUCCIÓN

Debido a la pandemia por COVID-19, el uso de elementos de protección personal (EPP) como guantes, cofias y mascarillas es una práctica rutinaria e indispensable, no sólo en los profesionales de salud, sino también en la población en general.

Actualmente, las disposiciones y regulaciones establecidas por el Ministerio de Salud del Perú ante la enfermedad del COVID-19 han sido menos estrictas con respecto al uso de EPPs en espacios abiertos o en centros de trabajos administrativos o que no brinden servicios de salud; no obstante, los centros de salud, hospitales, clínicas, laboratorios, entre otros, aún deben mantener el uso de mascarillas y otros EPPs para salvaguardar su salud¹.

Debido a su uso constante, se genera la reutilización o uso prolongado de las mascarillas sin un adecuado tratamiento, lo que incrementa el riesgo de contaminación de estos EPPs con microorganismos que pueden llegar a ser patógenos poniendo en riesgo la salud de las personas que reutilizan estas mascarillas².

En base a este contexto, se realizan constantes investigaciones cuyo objetivo es descontaminar y preservar la integridad de estos EPPs, en especial mascarillas, para garantizar su uso prolongado y evitar la acumulación de desechos con riesgo biológico³. Los métodos de desinfección de mascarillas son variados, existiendo cada vez más aplicaciones diferentes que buscan reducir considerablemente la carga microbiológica de la superficie de la mascarilla, así como mantener su integridad y funcionalidad⁴. Actualmente, los métodos de desinfección más utilizados son vapor de peróxido de hidrógeno y radiación ultravioleta tipo UVC⁵.

Por ese motivo, el objetivo de este trabajo de tesis se basa en evaluar el uso de radiación UVC en la reducción de microorganismos mesófilos y el efecto en la estructura de fragmentos de mascarillas KN95.

I. ANTECEDENTES

La tecnología de descontaminación por radiación UVC se basa en la absorción de la luz UV en las células y la posterior disrupción del material genético, sea ADN o ARN en caso de virus y bacterias, concluyendo en la muerte celular del microorganismo⁶. Las principales lesiones en el ADN son de origen directo y se efectúan en dos bases pirimidínicas adyacentes formando compuestos como el dímero cis-sin-ciclobutano (CPD) o fotoproductos como pirimidin (6,4) pirimidona (6,4-PP), los cuales conllevan a la muerte celular⁷.

La desinfección por radiación UV se encuentra en constante investigación por su eficacia en la reducción de microorganismos, su importancia se incrementó por la pandemia por COVID-19, ya que no todos los tipos de UV tienen una acción germicida similar y existen parámetros que pueden ser dañinos para el ser humano causando desde riesgo de irritación en piel y ojos hasta carcinogénesis⁸. Estos parámetros potencialmente dañinos de la luz UV han permitido clasificar la radiación UV en tres diferentes tipos⁹: radiación tipo UVA, UVB y UVC. La radiación tipo UVA está comprendida en los valores de 315 – 400 nm de longitud de onda, siendo la menos efectiva en acción germicida y la más penetrante en la piel humana, pudiendo llegar a la dermis y causar daños a ese nivel¹⁰. La radiación tipo UVB comprendida entre 280 – 315 nm de longitud de onda puede tener acción germicida efectiva en sus valores más inferiores, no obstante, requiere de una mayor cantidad de energía y, debido a que puede penetrar hasta la epidermis de la piel humana, puede causar quemaduras severas¹¹. Finalmente, la radiación tipo UVC comprende entre 100 – 280 nm de longitud de onda, es el tipo de reacción más

efectivo en acción germicida y menos dañino para el humano ya que, en su mayoría es absorbido en la atmósfera y no penetra profundamente en la piel humana¹².

Además, de acuerdo con la investigación de Villarroel, D. y col.¹³ el 95% de luz UV absorbida por un espectrofotómetro en el pico más alto de acción germicida sobre vegetales correspondía a la longitud de onda de 265 nm, evidenciando que la luz UV tipo C es la más efectiva en cuanto a reducción de carga microbiana¹³. Por tal motivo, se están desarrollando tecnología de desinfección por radiación tipo UVC por sus características germicidas y menos penetrantes para la piel humano, por ejemplo, cámaras con lámparas UVC para desinfección de frutas y vegetales; lámparas UVC colocadas en la parte superior de salas clínicas o centros nosocomiales cuya incidencia se limita a los lados laterales del techo de estas salas y funciona, conjuntamente, con mecanismos de ventilación que empujan las partículas inertes o vivas a la parte superior para ser eliminadas por la radiación; y la desinfección de EPP como mascarillas, guantes, guardapolvos en cámaras con lámparas UVC con estantes a una distancia fija de las lámparas¹⁴. Además, una investigación desarrolló cámaras portátiles con lámparas UVC comprobando su efectividad en la inactivación del virus del COVID-19 en mascarillas quirúrgicas demostrando la eficacia de la luz UVC y del diseño compacto, portátil y de fácil uso de las cámaras¹⁵.

Igualmente, se ha demostrado la efectividad germicida de la radiación UVC contra microorganismos que poseen mecanismos de resistencia tales como esporas, en el caso de *Aspergillus fumigatus* y *B. subtilis*; y genes de resistencia a antibióticos como *S. aureus* MRSA y *Acinetobacter baumannii*; generando una considerable reducción de la población microbiana en distancias entre 2 – 5 m entre la fuente de

radiación UVC y la superficie contaminada por periodos de tiempos de 15 minutos¹⁶. Asimismo, en otra investigación se determinó que para cada microorganismo es necesario calcular una dosis adecuada de radiación UV expresada en MWs/cm² obtenida a partir de la intensidad de radiación, distancia entre la luz y el elemento a desinfectar; y el tiempo de exposición; por otro lado, el tipo de microorganismo o forma bacteriana también influye en la acción de la radiación UV, ya que algunos son más resistentes que otros¹⁷. En esta investigación, los factores de distancia e intensidad se mantendrán constantes con el fin de evitar el aumento de variables en el trabajo experimental, por tal motivo, la dosis final se determinará a partir del tiempo de exposición y se evaluará el efecto en diferentes microorganismos y formas de vida microbiana.

Actualmente, el aumento de la demanda de mascarillas y respiradores para profesionales del sector de salud y para la población en general ha ocasionado que las importaciones de estos productos y su distribución se genere en un mayor tiempo que lo usual, produciendo escasez¹⁸. Si bien, las restricciones del uso de mascarillas en espacios públicos y privados han disminuido considerablemente, aún existe el riesgo de contraer la enfermedad y la demanda de mascarillas se ha centralizado en los centros de salud públicos y privados así como en los laboratorios clínicos, ya que las autoridades nacionales mantienen obligatorio su uso en estos establecimientos¹⁹.

Por tal motivo, la escasez de mascarillas impulsa el hábito de reutilizarlas o prolongar su uso para protegerse contra enfermedades infecciosas como el COVID-19, no obstante, su reutilización no es recomendada por el alto riesgo de contaminar las mascarillas con microorganismos patógenos y contraer enfermedades²⁰. Esto

conlleva a implementar métodos que prolonguen el tiempo de vida de las mascarillas para poder ser reutilizadas o desechadas de manera más segura, estos métodos se concentran en la desinfección de mascarillas o reducción de carga microbiana, así como el mantenimiento de la eficacia de filtración de las mascarillas²¹. Por ejemplo, en el artículo de revisión realizado por Alcaraz, J. *et al* 2021 menciona que las mascarillas clasificadas como IIR pueden lavarse hasta 10 veces o lavarse hasta 5 veces y luego desinfectarse hasta 5 veces por radiación o exposición a óxido de etileno manteniendo sus características físicas y su capacidad protectora²¹.

El Seguro Social de Salud del Perú, a través del Instituto de Evaluación de Tecnologías en Salud e Investigación (IETSI), en el año 2020, desarrolló una guía para la descontaminación de mascarillas y respiradores donde establecen tres métodos probados efectivos para este fin, entre ellos están: desinfección por vapor de peróxido de hidrógeno (VPH), siendo el más efectivo en acción germicida ya que redujo la carga microbiana inoculada en un 99% de efectividad luego de una exposición de 20 minutos a 2 g/min de VPH y el que menos daños causa a la estructura de la mascarilla incluso luego de 20 ciclos de exposición, no obstante, es el más costoso para su implementación en laboratorios; desinfección por radiación UVC, siendo un germicida efectivo pudiendo reducir entre el 90 – 99% de la carga microbiana en una dosis de UV de 0.5 – 950 J/cm² manteniendo la distancia y el tiempo de exposición constantes y con efectos mínimos a moderados en la estructura de las mascarillas dependiendo de las características de las mismas y la cantidad de ciclos de exposición; y esterilización por autoclave, siendo efectivo en la eliminación total de microorganismos a una temperatura de 60°C por 15 – 30

minutos de exposición, pero genera la mayor cantidad de daños en la estructura interna de las mascarillas²².

Un estudio ha demostrado una reducción logarítmica mayor a 5, según los datos obtenidos del crecimiento de microorganismos de vida libre como *S. aureus* y *P. aeruginosa*, luego de usar radiación tipo UVC durante 2 minutos de exposición en 1 ciclo de tratamiento²³. Del mismo modo, debido a la situación actual de la pandemia por COVID-19, se ha catalogado a la radiación UVC como método de descontaminación de mascarillas para personal de salud, demostrando que el uso de dicho método permite mantener las características de filtración de la mascarilla y reduce considerablemente la carga viral del SARS-CoV-2 demostrado mediante RT-PCR²⁴. Con respecto a la integridad de la mascarilla, se ha demostrado que luego de la exposición a una luz UV de 40 W de intensidad por 30 minutos (15 minutos cada lado), a pesar de encontrarse cambios a nivel microscópico de la estructura tales como degradación o derretimiento de algunas fibras, no se observó penetración de partículas luego de ser probada con aerosol de cloruro de sodio demostrando el mantenimiento en su eficacia de filtración²⁵. Debido a esta evidencia mostrada, se utilizará como método de desinfección, en este trabajo de tesis, a lámparas de luz UVC bajo las mismas condiciones para evaluar su capacidad en la reducción de carga microbiana.

Los ensayos de evaluación de carga microbiana en las mascarillas son similares para cualquier tipo de mascarilla o respirador que se evalúe; de acuerdo con la Norma Técnica Peruana (NTP 329.200:2020 (Materiales Médicos. Mascarillas quirúrgicas. Requisitos y métodos de ensayo. 1ª Edición) sobre métodos de ensayo para mascarillas quirúrgicas y respiradores, estos elementos pueden clasificarse en

dos tipos, siendo el tipo I utilizado en pacientes o profesionales de la salud que se encuentre fuera de un quirófano y cuyas características permiten la retención del virus, tales como las mascarillas KN95; los respiradores tipo II son los utilizados por profesionales de salud que mantienen contacto con pacientes dentro de un quirófano, para ambos tipo el valor de carga biológica permitida es ≤ 30 ufc/g)²⁶. Asimismo, la Farmacopea Americana (USP)²⁷ en su última edición especifica los procedimientos a seguir para la prueba de aptitud del método de recuento microbiano de dispositivos médicos incluyendo a las mascarillas y respiradores en esta categoría; dentro de los procedimientos explica que esta prueba debe llevarse a cabo con indicadores biológicos certificados, los cuales incluyen preparación de inóculos bacterianos, estandarización de inóculos entre 10 – 100 ufc/mL y posterior recuperación de microorganismos. Entre las cepas mencionadas se cuentan con patógenos entéricos como *E. coli* ATCC 8739; patógenos oportunistas cutáneos y de las mucosas como *S. aureus* ATCC 6538 y *P. aeruginosa* ATCC 9027; y microorganismos esporulados ambientales como *B. subtilis* ATCC 6633 y *A. brasiliensis* ATCC 16404²⁸. En este trabajo de tesis se utilizarán las cinco cepas mencionadas anteriormente y se seguirá el procedimiento de recuento microbiano establecido por lo establecido por la USP.

Finalmente, en esta investigación el objetivo principal es demostrar la eficacia de desinfección y el efecto en la estructura de fragmentos de mascarillas KN95 inoculadas con diferentes microorganismos utilizando radiación UVC en diferentes tiempos de exposición.

II. HIPÓTESIS

Si se exponen fragmento de mascarillas KN95 a radiación tipo UVC por un tiempo determinado entonces se obtendrá una reducción del 90 – 99% de la población microbiana inoculada en los fragmentos de mascarillas resultando en una acción germicida eficaz y se preservarán las estructuras internas de las mascarillas luego de exponerlas a la radiación garantizando el correcto funcionamiento de estas.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el uso de radiación UVC en la reducción de la carga de microorganismos mesófilos y su efecto en la estructura de fragmentos de mascarillas KN95.

Objetivos específicos

Establecer el tiempo de exposición necesario, entre los tiempos de evaluación 1.5 min, 2 min, 5 min y 10 min, para obtener una acción germicida eficaz en fragmentos de mascarillas KN95 inoculadas con las cepas *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *A. brasiliensis* ATCC 16404 y *B. subtilis* ATCC 6633.

Describir el efecto de un ciclo de tratamiento, por cada tiempo de exposición a UVC evaluados, causados en la estructura y composición de mascarillas KN95.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

La presente investigación consiste en un estudio experimental, cuantitativo y transversal debido a que se generaron datos estadísticos obtenidos de la cuantificación de la desinfección de mascarillas KN95 expuestas a UVC medido por la reducción de la carga microbiana inoculada a las muestras.

Muestra

Se utilizaron mascarillas KN95 certificadas con la norma GB2626-2006 de la marca XO (Crawford Technology CO-, Ltd) procedente de China (Fig. 1). Dichas mascarillas tienen la capacidad de filtrar hasta un 95% de partículas viables y no viables. Estas mascarillas fueron cortadas en 192 fragmentos cuadrados de un perímetro total de 4 cm para el análisis con inóculos bacterianos, debido al tamaño del equipo de desinfección de luz UVC y la facilidad en la manipulación; en el caso de análisis de estructura y composición de mascarillas se utilizaron 15 mascarillas KN95 completas las cuales fueron procesadas por microscopía electrónica. Las cepas certificadas de microorganismos consistieron en cuatro cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y una cepa fúngica: *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.



Fig. 1: Mascarillas KN95 utilizadas en el presente trabajo de tesis

Técnicas y procedimientos

Obtención de inóculos de los microorganismos utilizados

Para obtener los inóculos bacterianos se realizaron diluciones sucesivas para cuantificación de bacterias cultivables de acuerdo a la Farmacopea Americana²⁷. Este procedimiento se basa en sembrar los microorganismos certificados: *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027 y *E. coli* ATCC 8739. Estos microorganismos fueron adquiridos en la presentación de KWIK-STIK™, por tal motivo fueron sembrados por dispersión en dos placas de Agar tripticasa soya (TSA) cada cepa, posteriormente se incubaron a 35°C por 48 horas y luego, se recuperó todo el crecimiento microbiano obtenido, de las dos placas sembradas de cada cepa, en 100 mL de Solución salina (SS) utilizando un asa de siembra, en un frasco estéril correspondiendo a la suspensión madre (dilución 10⁰). A continuación, se realizaron diluciones sucesivas 1/10, en tubos con 9 mL de SS estéril, a partir de la suspensión madre desde 10⁻¹ hasta 10⁻¹⁰. Finalmente se extrajo 1 mL de cada dilución el cual fue colocado en placas por triplicado para luego sembrar por incorporación con TSA e incubar a 35°C por 48 – 72 horas. Al final de la incubación, se contaron las colonias obtenidas y se calcularon los promedios de

cada dilución. Para los ensayos en esta investigación se utilizó la dilución que tenía una concentración de 10 – 100 ufc/mL de microorganismos.

Para obtener esporas, se utilizaron cepas certificadas productoras de esporas. En el caso de *B. subtilis* ATCC 6633 se procedió de acuerdo a lo descrito por Setlow B. y col.²⁹ Para ello, se reactivó la cepa de *B. subtilis* en TSA, a continuación, una de las colonias obtenidas fue subcultivada en Caldo de esporulación 2x Schaeffer-Glucosa (2xSG) e incubada a 37°C y 150 rpm hasta alcanzar una fase logarítmica ($0.45 < A_{600} < 0.6$). Posteriormente, se completó la cantidad de medio de cultivo requerida para 250 mL y se incubó a 37°C y 150 rpm por 10 días. Pasado el tiempo de incubación se procedió a confirmar la generación de esporas mediante tinción de verde de malaquita, para luego centrifugar el crecimiento obtenido a 4696 g en 4°C por 25 minutos. Finalmente, de acuerdo a lo descrito por Nicholson, W. y Galeano, B., a partir del pellet obtenido se procedió a purificar las esporas³⁰; para ello, se resuspendió el pellet en una solución 1:6 de 15 mg/mL de lisozima y solución salina de buffer fosfato de Dulbecco (DBPS), y se incubó a 4°C por 48 horas. Inmediatamente después de la incubación, se centrifugó la suspensión a 4696 g en 4°C por 25 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril y se procedió a centrifugar nuevamente en las mismas condiciones. Del mismo modo, se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 20 mL de agua destilada estéril y se conservó a 4°C. Debido a que no se contaba con el instrumento necesario para el conteo microscópico de esporas, se procedió a determinar el inóculo contabilizando colonias del microorganismo generadas por la reactivación de la esporas. Por tal motivo, en la determinación del inóculo, se realizaron diluciones sucesivas de

acuerdo a lo descrito en la obtención de inóculos bacterianos, y se colocó 1 mL de cada dilución en placas por triplicado, posteriormente, se procedió a sembrar por incorporación con TSA para cuantificar que el inóculo se encuentre entre 10 – 100 ufc/mL de microorganismos viables de acuerdo a lo mencionado en la Farmacopea Americana (USP)²⁷.

Por otro lado, para el caso de la cepa fúngica *A. brasiliensis* ATCC 16404 se realizó la obtención y reactivación de las esporas de acuerdo a lo descrito por De Farias, V. y col.³¹ Por consiguiente, se reactivó la cepa certificada en dos placas de Agar Sabouraud Dextrosa (DSA), sembradas por dispersión, las cuales se incubaron a temperatura ambiente por 5 – 7 días. A continuación, se procedió a subcultivar el crecimiento obtenido en cinco placas de DSA, en toda la superficie de la placa con ayuda de un hisopo, y se incubaron a 20 – 25°C por 7 – 10 días con el fin de promover el desarrollo de las colonias fúngicas. Finalmente, con ayuda de un asa siembra se recuperaron las esporas raspando la superficie de los hongos con SS y se conservaron a 4°C hasta su uso. Para la determinación del inóculo, se procedió a realizar diluciones sucesivas a partir de la suspensión madre, a continuación se colocó 1 mL de cada dilución en placas por triplicado y se sembró por incorporación con DSA para cuantificar que el inóculo se encuentre entre 10 – 100 ufc/mL de colonias fúngicas.

Inoculación de fragmentos mascarillas KN95

Las concentraciones obtenidas de cada microorganismo fueron inoculadas en segmentos de mascarillas de KN95 de 2 cm x 2 cm. Se inoculó 1 mL por cada segmento, en la parte externa de la mascarilla, se dejó secar por un lapso de 5 – 10

minutos dentro de la cabina de bioseguridad y se utilizaron 3 segmentos por cada intervalo de tiempo. A su vez, cada intervalo de tiempo se repitió por 3 veces teniendo un total de 9 segmentos por cada intervalo de tiempo por cada cepa.

Desinfección de fragmentos de mascarillas

El ensayo consistió de tres tratamientos agrupados de la siguiente manera: grupo control, el cual consistió en:

1. El grupo control de la cepa, para ello se colocó 1 mL de los inóculos de cada microorganismo en una placa y se sembró por incorporación en TSA, para el caso de las bacterias, y en DSA, para el caso del hongo. Estas cepas no fueron expuestas a radiación UVC con el fin de conocer la cantidad aproximada de microorganismos inoculados en las muestras.
2. El grupo control de la muestra, el cual se basó en colocar fragmentos de mascarilla no inoculada y sin exposición a radiación UVC con la finalidad de evidenciar que los fragmentos de mascarillas no presentan una flora microbiana acompañante que pueda interferir en los resultados del ensayo
3. El grupo de prueba, el cual consistió en cuatro tratamientos que se diferencian en el tiempo de exposición a radiación UVC de las muestras inoculadas los cuales fueron 1.5, 2, 5 y 10 minutos utilizando cuatro lámparas UVC con las mismas condiciones (ver tabla 1).

TABLA 1

Grupos de tratamiento					
Grupo Control		Grupos de Prueba			
Control de la cepa	Control de la Muestra	Tiempo de exposición a UV			
Cepa sembrada en agar	Muestra sin inocular ni exponer a UV	1.5 min	2 min	5 min	10 min

Equipo de Desinfección

El equipo de Desinfección utilizado en este trabajo de tesis fue desarrollado por el Mag. Andrés Flores Espinoza y su equipo de la Pontificia Universidad Católica del Perú en colaboración con la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El equipo contaba con las siguientes características:

- Cuatro lámparas germicidas tipo UVC de marca Philips® Modelo T18 15W de 45 cm con sus respectivos balastos.
- Sistema computacional basado en computadora Raspberry Pi modelo 3B+ con teclado y pantalla LCD.
- Circuito electrónico de potencia para el encendido de lámparas UVC basado en 4 relés de estado sólido.
- Sensor de temperatura y humedad DHT22 (AM2302).
- Sistema ILT2400 UVGI-NB de International Light Technologies® para la rendición de fuentes de luz germicidas UVC de 254 nm.
- Chasis de microondas marca Samsung® para la estructura del equipo.

El equipo se conectó a una fuente de poder de 220 VAC y se procedió a utilizar el panel LCD para controlar la cantidad de lámparas encendidas y tiempo de exposición (Fig. 2).



Fig. 2: Equipo de desinfección por radiación UVC

Análisis de la recuperación del crecimiento microbiano

Al finalizar la exposición de las muestras a radiación, el recuento microbiano se realizó de acuerdo con la prueba de aptitud mencionada en la Farmacopea Americana (USP)²⁷. Estas muestras se colocaron de forma individual en tubos con 10 mL de B7 donde se procedió a agitar suavemente, con ayuda de un vórtex, para desprender los microorganismos adheridos a las muestras. A continuación, se sembró por incorporación 1 mL de esta suspensión en TSA. Las placas fueron incubadas a 35°C por 3 – 5 días manteniendo una observación constante del crecimiento bacteriano. Las esporas aisladas de las cepas certificadas fueron tratadas de la misma manera que se menciona anteriormente, el conteo se realizó a partir de los microorganismos que se recuperaron de las esporas que se mantuvieron viables luego de la exposición a la radiación UVC. Finalmente, se registraron los resultados y se calculó el porcentaje de recuperación de microorganismos con

respecto al control de la cepa descrito en el punto anterior, asimismo, se procedió a calcular el logaritmo de la reducción microbiana obtenida para fines gráficos.

Análisis de la estructura de las mascarillas KN95

Para poder establecer que la exposición al tiempo de radiación UVC genera efectos negativos en la composición física de la mascarilla estas muestras fueron expuestas a radiación UVC en los diferentes intervalos de tiempo descritos anteriormente por la parte externa. Es así como, las muestras se agruparon en los siguientes tratamientos: control, el cual consistió en tres muestras que no han sido expuestas a radiación UVC; y grupo de prueba los cuales consistieron en exponer tres muestras en cada intervalo de tiempo evaluado utilizando mascarillas sin agregarle 1mL de SS estéril y fragmentos de mascarillas KN95 agregando 1 mL de SS estéril igualando las condiciones de los fragmentos de mascarillas con inóculos bacterianos. A continuación, para el análisis morfológico de las mascarillas se emplearon segmentos de la parte externa de la mascarilla elegidos aleatoriamente y la señal proveniente del detector de electrones secundario acoplado al microscopio electrónico de barrido FEI modelo Quanta 650 proveniente de Alemania. La adquisición de imágenes se realizó a distintas ampliaciones (50x, 100x y 200x) y fue operada a 15KV con la finalidad de visualizar la estructura polimérica de cada capa en cada muestra. Todas las medidas fueron tomadas en una cámara con ambiente vacío, y previamente cada muestra fue ubicada en una porta-muestra de aluminio y fijada con la ayuda de una cinta adhesiva de carbono para posteriormente cubrir la muestra con una fina capa de oro con el objetivo de mejorar la adquisición de las imágenes. El análisis de las estructuras internas observadas fue clasificado cualitativamente con una puntuación del 0 al 3 utilizando campos seleccionados

aleatoriamente de la mascarilla. Esta clasificación fue propuesta para efectos del presente estudio por autoría propia, siendo 0 la ausencia de alteraciones en las estructuras y 3 presencia de varias alteraciones en las estructuras internas de las mascarillas. Las alteraciones más resaltantes para evaluar fueron aquellas especificadas por Ogbuoji, E. y col.²⁵: deformaciones de los tejidos, derretimiento de las fibras, aglomeraciones excesivas de las fibras y presencia de orificios o dilataciones de las fibras.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de los resultados utilizando las pruebas de análisis de varianza y t de Student para muestras relacionadas entre el control y los tiempos de exposición a UV considerados en este estudio, se estableció que el valor de $p < 0.05$ aceptaba la hipótesis de que los porcentajes de recuperación obtenidos en las muestras presentan varianzas homogéneas y son significativamente diferentes entre sí y con respecto al control. Asimismo, se realizó el cálculo de reducción logarítmica para poder graficar el comportamiento de los datos obtenidos y determinar, según Ontiveros, C. *et al* 2021, si la acción germicida es eficaz al reducir 1 o más escalas logarítmicas el crecimiento microbiano resultante del control y luego de la exposición a radiación²⁴. Para el caso del análisis de la estructura de mascarilla, se realizó la comparación de las imágenes obtenidas de los tratamientos con respecto al control y se describieron las observaciones obtenidas realizando una puntuación del 0 al 3 tal como se ha descrito anteriormente.

V. RESULTADOS

Obtención de inóculos bacterianos

Los inóculos bacterianos cuya concentración se encontraba entre 10 – 100 UFC/mL fueron determinados en la dilución 10^{-8} a partir de la suspensión madre preparada de acuerdo con la metodología; por otro lado, la concentración de esporas deseada se obtuvo en la dilución 10^{-7} (ver anexo 2 y tabla 2).

Tabla 2

Conteo de los inóculos bacterianos entre las diluciones 10^{-7} – 10^{-10}

Cepas	Placa	Conteo por diluciones (UFC/mL)			
		10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	1	458	41	5	0
	2	465	45	7	1
	3	487	39	4	0
	Prom.	470	42	5	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	1	247	25	2	0
	2	233	27	5	0
	3	214	25	4	1
	Prom.	231	26	4	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1	368	33	3	1
	2	341	38	8	0
	3	333	45	7	1
	Prom.	347	39	6	1
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1	29	2	0	0
	2	33	1	1	0
	3	28	1	0	0
	Prom.	30	1	0	0

<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	1	14	0	0	0
	2	16	0	0	0
	3	18	1	0	0
	Prom.	16	0	0	0

Análisis de crecimiento microbiano recuperado después de la desinfección de mascarillas

Los resultados indican que existe una reducción considerable de la carga microbiana a partir de los 2 minutos de exposición utilizando 4 lámparas UV con las mismas características (ver anexo 2). Todos los microorganismos utilizados presentan una reducción en el recuento de los grupos de prueba con respecto al grupo control y, en su mayoría, eliminación total de los inóculos a partir de los dos minutos de exposición a la luz UVC, demostrando que la penetración de la radiación sobre las superficies de mascarillas KN95 es efectiva como desinfectante (tabla 3).

Tabla 3

Promedio de la recuperación microbiana obtenido después de la desinfección de mascarillas por radiación UV (IC 95%)

Cepas	Promedio	Conteo promedio según tiempo de exposición a UV (UFC)								
		Control (Sin UV)	1.5 min	Valor p*	2 min	Valor p	5 min	Valor p	10 min	Valor p
Control (Sin inóculo)	3 piezas	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
<i>E. coli</i> ATCC 8739	9 piezas	38	8	0.04	0	0.01	0	0.01	0	0.01
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	9 piezas	28	4	0.01	0	0.03	0	0.02	0	0.02
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	9 piezas	38	8	0.03	0	0.01	0	0.03	0	0.03
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	9 piezas	26	4	0.02	0	0.03	0	0.03	0	0.03
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	9 piezas	19	1	0.01	0	0.01	0	0.00	0	0.00

*Valor p obtenido de la prueba t de Student para muestras relacionadas entre el control y cada uno de los tratamientos de desinfección

UV realizados (IC 95%).

Tabla 4

Logaritmo del crecimiento bacteriano

Cepas	Promedio	Cálculo logarítmico				
		Control (Sin UV)	1.5 min	2 min	5 min	10 min
<i>E. coli</i> ATCC 8739	9 piezas	1.58	0.9	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	9 piezas	1.45	0.6	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	9 piezas	1.58	0.9	0	0	0
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	9 piezas	1.41	0.6	0	0	0
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	9 piezas	1.28	0	0	0	0

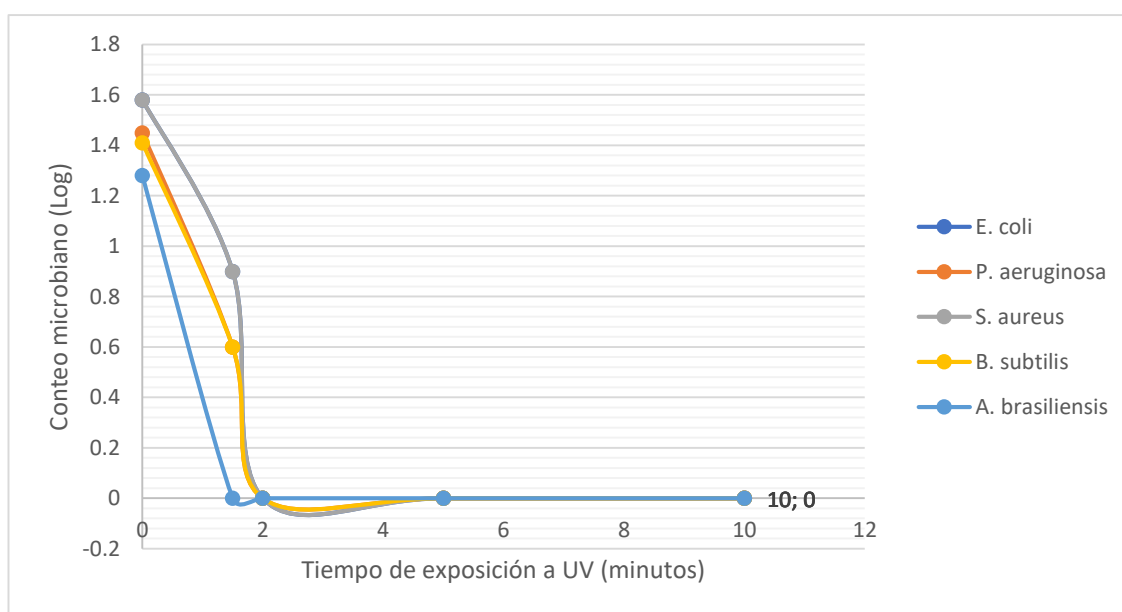


Figura 3. Reducción logarítmica del crecimiento microbiano

Según el cálculo logarítmico podemos deducir que la reducción de 1 o más logaritmos en el crecimiento bacteriano se obtiene a partir de los 2 minutos de exposición a radiación UVC en los microorganismos *E. coli* ATCC 8739, *P.*

aeruginosa ATCC 9027, *S. aureus* ATCC 6538 *B. subtilis* ATCC 6633. Por otra parte, el hongo *A. brasiliensis* ATCC 16404 muestra dicha reducción de crecimiento microbiano a partir del minuto 1.5 siendo el más sensible a la exposición a radiación UVC. Esta diferencia puede estar relacionada a la fisiología de cada microorganismo, las esporas fúngicas son estructuras reproductivas de los hongos, formadas por dos capas de membrana que engloban un espacio citoplasmático que puede contener vacuolas, mitocondrias, cuerpos de inclusión y gránulos intracitoplasmáticos³²; a diferencia de las esporas bacterianas formadas por un protoplasto con membranas definidas y ribosomas evidenciados internamente, asimismo, conforman estructuras de resistencia ante condiciones ambientales adversas³³ (tabla 4, figura 3).

Por otro lado, se realizó el análisis estadístico entre los datos obtenidos (tabla 5). Los resultados estadísticos obtenidos para todos los microorganismos muestran que existen diferencias significativas entre los resultados del control con cada uno de los tratamientos realizados ($p < 0.05$) (tabla 3). Es decir, estadísticamente, la radiación UVC utilizada es eficaz a partir del minuto 1.5 como acción desinfectante para los microorganismos evaluados. No obstante, se debe tomar en cuenta, de acuerdo con la bibliografía, la reducción logarítmica y el porcentaje de reducción real comparando el crecimiento luego de la exposición con respecto al control.

Análisis de la estructura de la mascarilla KN95

Finalmente se realizó el análisis de la estructura de la mascarilla KN95 luego de ser expuesta a la radiación UVC. Esto debido a que la radiación, el calor y el tiempo de exposición pueden afectar la estructura fibrilar de la mascarilla reduciendo su

capacidad para filtrar, por lo que no podría considerarse como un método eficaz para usarse como acción germicida.

La valoración del efecto del UVC en las mascarillas KN95 no muestra diferencias entre las mascarillas a las que se les agregó SS y aquellas que no se le agregó dicha solución, es decir, que la presencia del inóculo bacteriano en las mascarillas KN95 utilizadas durante el ensayo de acción germicida del UVC no afecta significativamente en la estructura del elemento de protección personal (Tabla 5).

Tabla 5

**Valoración del efecto de la radiación UV en la estructura de las mascarillas
KN95**

Muestra	Tiempo de exposición											
	1.5 min			2 min			5 min			10 min		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A*	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	3	3
B**	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	3

*Corresponde a una mascarilla KN95 sin agregar SS estéril.

**Corresponde a una mascarilla KN95 agregando 1mL de SS estéril

Por otro lado, el daño estructural en la escala 0 a 3 nos indica que las puntuaciones de “0” corresponden a la ausencia de daño estructural en los campos vistos al microscopio; las escalas valoradas como “1” y “2” indican presencia de daños mínimos presentados tales como engrosamiento de las fibras, leve derretimiento y ausencia de obstrucción; finalmente la escala 3 indicó la presencia de derretimiento moderado de las fibras y obstrucciones. De acuerdo con ello, obtenemos que a partir

del tiempo de exposición de 5 minutos se comienza a visualizar daños en la estructura de la mascarilla y siendo el tiempo 10 minutos donde se observan características de la escala 3 siendo perjudicial para el correcto funcionamiento de las mascarillas.

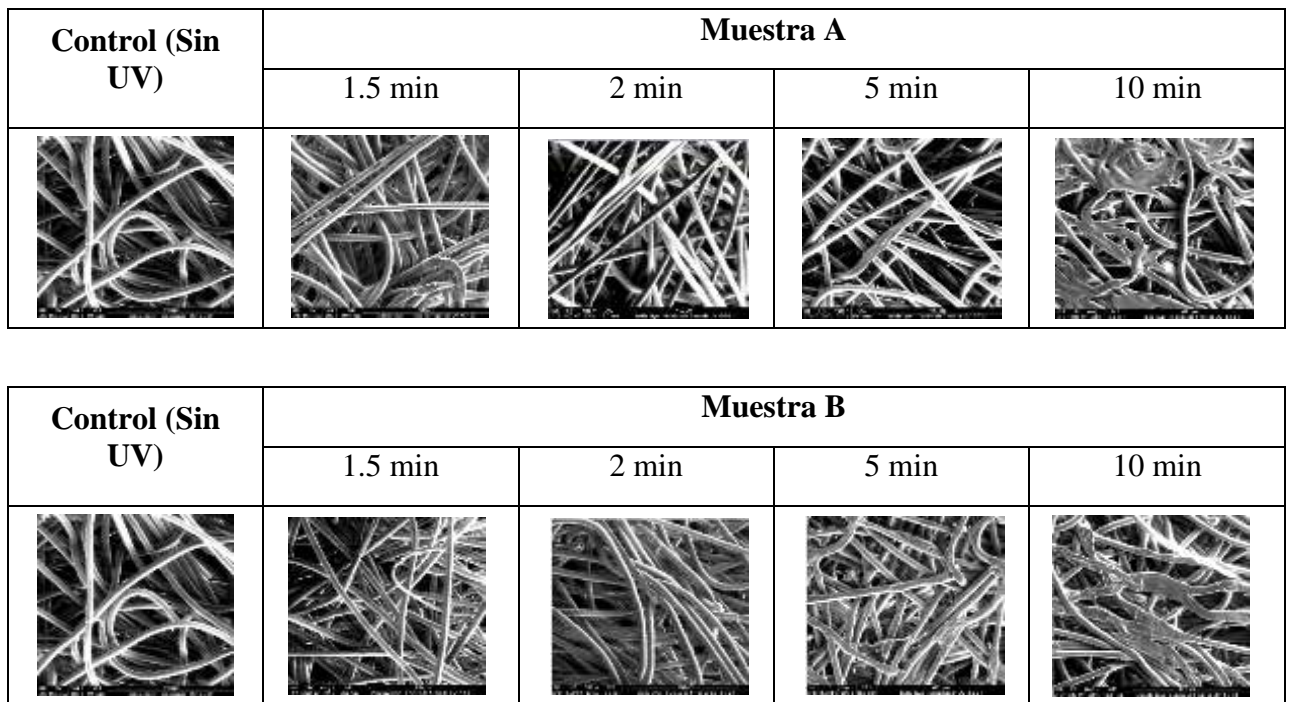


Figura 4: Imágenes de microscopía electrónica representativas de las fibras de la mascarilla luego de la exposición a UV

VI. DISCUSIÓN

La radiación ultravioleta se ha utilizado como instrumento germicida desde hace varios años, esto debido a que es capaz de penetrar células microbianas y partículas virales degradando el material genético y evitando la replicación y propagación de agentes patógenos, principalmente se han desarrollado equipos que permiten la reducción de carga microbiana en ambientes hospitalarios donde se busca establecer dosis de UVC que sean altamente efectivas y no dañinas para el ser humano³⁴. En esta adaptación, se ha observado incluso que es efectiva en la eliminación de microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Clostridium difficile*, siendo apto para reducir no sólo estadios viables bacterianos sino también estructuras bacterianas resistentes como las esporas³⁵, así como también ha sido demostrado en esta investigación al utilizar *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

En este trabajo de investigación es relevante que se pueda reproducir esta metodología para otras cepas microbianas y comparar los resultados obtenidos. Por ello, el uso de diferentes microorganismos, otorga variabilidad al ensayo y permite evaluar la recuperación microbiana luego de exposición a UVC con respecto a cada cepa, es así que, se utilizan cepas patógenas como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*; así como cepas ambientales tales como *Bacillus subtilis* y *Aspergillus brasiliensis*³⁶. Por tal motivo, el uso de cepas certificadas ATCC, otorga confiabilidad al ensayo realizado debido a las características intrínsecas de las cepas, los resultados obtenidos demuestran que la radiación UVC es eficaz como germicida, debido a que los microorganismos son susceptibles a exposición de la radiación en los

tiempos evaluados, lo que refuerza la idea de obtener mascarillas descontaminadas³⁷.

En el presente estudio se emplearon fragmentos de mascarillas de la misma marca durante todo el proceso de análisis, no obstante, el procesamiento de las muestras fue poco convencional y se optó por ello debido a las dimensiones del equipo y la facilidad de manipulación. El empleo de cortes de mascarillas son prácticas habituales de las industrias farmacéuticas para analizar la calidad microbiológica de los dispositivos médicos³⁸, pero puede resultar una limitante para el análisis correcto de la desinfección, debido a que la cepa no puede propagarse en la totalidad de la superficie de la mascarilla. El uso de mascarillas completas y un equipo de luz UVC con características más sofisticadas permiten evaluar la inactivación del microorganismo por cada capa de la mascarilla desde la superficie hasta la capa interna, asimismo, brinda un panorama más amplio de la distribución de la carga microbiana en toda la mascarilla pudiendo establecer los puntos de contaminación en la parte superior, media o inferior³⁹. Por consiguiente, si bien el ensayo realizado en esta tesis con fragmentos mascarillas nos generó datos significativos de la acción germicida de la luz UVC, es necesario realizar un escalamiento del ensayo con mascarillas completas y un equipo de mayor alcance.

Un factor importante a considerar es la dosis de UVC requerida en los métodos de desinfección; en esta investigación la dosis de radiación no ha sido calculada debido a que faltaban factores de potencia y energía necesarios para el cálculo pero se han mantenido los mismos parámetros de distancia, cantidad de lámparas UVC usadas e intensidad de luz debido a que el objetivo del ensayo era encontrar diferencias con respecto a las cepas utilizadas, por otro lado, otras investigaciones determinan dosis

óptimas de luz UVC para cada tipo de microorganismo evaluado estableciendo rangos que garanticen la desinfección más eficaz posible⁴⁰. El efecto más significativo de no considerar estos datos en esta tesis es de no poder demostrar que las cepas utilizadas fueron eliminadas por una alta dosis de UVC o si existe una diferencia significativa entre las cepas con respecto al tiempo de exposición considerando la dosis como un factor constante. Por otro lado el valor de la dosis de UVC puede darnos alcances en futuras investigaciones sobre la acción germicida más eficaz de la radiación UVC. Por ejemplo, se ha demostrado que la aplicación de dosis entre 20000 J/m² y 40000 J/m² reduce significativamente la carga microbiana en la superficie externa de los materiales⁴¹.

El tipo de radiación también es un factor relevante en la decisión de usar métodos de desinfección seguros, en esta investigación la luz UV evaluada es de tipo C, si bien es eficaz en su acción germicida también tiene un efecto casi inocuo sobre la piel humana, reduciendo posibles daños a la salud; en contraste, investigaciones sostienen que la luz UV-A puede también utilizarse como germicida en una longitud de onda de 365 nm, sin embargo, puede ser dañina para la salud humana⁴². Estos hallazgos permiten dilucidar otras adaptaciones a partir de los resultados presentados en esta investigación con el fin de mejorar los modelos tecnológicos de radiación UV para desinfección de elementos de protección personal.

En otro estudio, se comparó la efectividad de la radiación UVC en la reducción de un inóculo de esporas de *Geobacillus stearothermophilus*, microorganismo parecido en características de resistencia a *Bacillus subtilis*, en marcarillas con el uso de luz UVC, obteniendo una reducción significativa, similar en ambos tratamientos, de 5 Log utilizando una dosis de 1.1 J/cm² permitiendo la

reutilización de dichas mascarillas⁴³. Además, cabe resaltar que la inactivación de esporas por parte de la luz UVC ha sido demostrado en bacterias como *Bacillus cereus* utilizando una dosis de 5 mW/cm² por 60 minutos, disminuyendo el tiempo a medida que se aumenta la dosis, llegando a tener una reducción aproximada de 4 Log usando 25 mW/cm² en 10 minutos⁴⁴; asimismo, se ha observado un comportamiento similar en cepas fúngicas de la cepa *Rhizopus oryzae* consiguiendo una reducción logarítmica de 4 Log luego de 10 minutos de exposición a UVC⁴⁵. Estos hallazgos difieren con los el tiempo de 2 minutos obtenido en este trabajo de tesis para las cepas de *B. subtilis* y *A. brasiliensis*; si bien, las metodologías utilizadas garantizaban la obtención de esporas se sugiere el uso imperativo de técnicas como microscopía o conteo en cámaras de Neubauer para garantizar su correcto aislamiento y uso en el presente trabajo de tesis.

El análisis estructural de la mascarilla en esta investigación permite brindar un alcance inicial para futuras investigaciones que busquen profundizar los efectos colaterales de la constante exposición de las mascarillas KN95 a la radiación UV. Factores como el calor, la intensidad de luz, distancia, entre otros, son determinantes al momento de evaluar el efecto físico producido en las mascarillas. En el presente estudio, se ha demostrado que una exposición prolongada a radiación UV, a partir de los 5 minutos, genera la aparición de daños estructurales tales como derretimiento de las fibras, obstrucciones o rompimiento; otras investigaciones apoyan este resultado demostrando que una dosis inicial de UV, correspondiente a 1 J/cm², donde se colocaron mascarillas a radiación tipo UVC a 30 cm de distancia por 5 minutos, generó la presencia de cambios estructurales en las fibras disminuyendo eficacia y hermeticidad en las capas externas, media e interna a pesar

de ser del mismo material⁴⁶. Asimismo, se debería considerar analizar la estructura de la mascarilla no sólo inoculando B7 estéril como se realizó en este trabajo, sino también inoculando cepas para observar si existen diferencias en el daño estructural causado por sustancias orgánicas el cual no fue considerado en este estudio por el tiempo permitido de uso del equipo de desinfección.

Otra investigación comparó los diferentes grados de degradación de las capas de las mascarillas luego de ser irradiadas por UV, y estas modificaciones se fueron intensificando a medida que exponían las mascarillas a mayor tiempo. La investigación mostró que si bien toda la mascarilla está compuesta por polipropileno, las diferentes capas se degradan de manera gradual y diferida luego de la radiación⁴⁷.

Esta información sugiere el desarrollo de más estudios que deben complementar a los resultados en este trabajo de tesis, por ejemplo, investigaciones basadas en el cálculo de dosis de UVC para establecer la acción germicida más eficaz e inocua para el ser humano; y aquella que esté relacionada con evitar cambios estructurales significativos en las mascarillas complementándose con un análisis físico mediante microscopía electrónica y espectroscopía para observar el efecto sobre las fibras de las mascarillas; así como un análisis químico de los componentes de las mascarillas que establezca una correlación en la disminución o incrementos de los compuestos químicos con los cambios estructurales y la eficacia de filtración.

VII. CONCLUSIONES

El análisis por tratamientos indica que el tiempo de exposición de los fragmentos de mascarillas a luz UVC con efecto germicida eficaz es a partir de los 2 minutos de exposición obteniendo una reducción logarítmica mayor a 1 para las cepas de *B. subtilis* ATCC 663, *A. brasiliensis* ATCC 16404, *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 9027 y *S. aureus* ATCC 6538.

En el análisis por microscopía se resalta la presencia de defectos del material ocasionado a partir de los 5 minutos de exposición a radiación UVC evidenciándose derretimiento de fibras y obstrucciones. Los tiempos de exposición de 1,5 y 2 minutos no presentaron efectos significativos.

VIII. RECOMENDACIONES

Se recomienda profundizar los resultados de esta investigación con respecto a las dosis de UV requeridas para una mejor eficacia de acción germicida a diferentes tipos de microorganismos, incluyendo virus como el SARS-CoV-2, y aquella dosis de UV que tenga una acción germicida de amplio espectro y que mantenga su característica inocua para la salud de las personas. . Asimismo, se promueve la investigación del efecto de radiación UV en la estructura de la mascarilla en las tres capas que lo componen pudiendo incluir no sólo análisis microscópico sino también químico y de uso diario para comparar los resultados obtenidos.

IX. REFERENCIAS

1. Ministerio de Salud del Perú. (2021). Directiva administrativa que establece las disposiciones para la vigilancia, prevención y control de la salud de los trabajadores con riesgo de exposición a SARS-CoV-2. Directiva Administrativa N° 321- MINSA/DEGIESP-2021, 1 – 28.
2. Toomey, E., Conway, Y., Burton, C., Smith, S., Smalle, M., Chan, X., Adishes, A., Tanveer, S., Ross, L., Thomson, I., Devane, D., Greenhalgh, T. (2020). Extended use or reuse of single-use surgical masks and filtering face-piece respirators during coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: A rapid systematic review. *Infect. Control and Hosp. Epidem.*, 1 – 9.
3. Weaver, D., McElvany, B., Gopalakrishnan, V., Card, K., Crozier, D., Dh Wan, A., Dinh, M., Dolson, E., Farrokhian, N., Hitomi, M., Ho, E., Jagdish, T., King, E., Krishnan, N., Kuzmin, G., Li, J., Maltas, J., Mo, J., Pelesko, J., Scarborough, J., Sedor, G., Tian, E., An, G., Diehl, S., Scott, J. (2020). UV decontamination of personal protective equipment with Idle Laboratory biosafety cabinets during the COVID-19 pandemic. <https://doi.org/10.1101/2020.03.25.20043489>
4. Farrel, M., Sanchez, E., Vásconez S., Alves, A., Sielfeld, M., Villas, L., Evangelista, N., Tozetto, T., Goncalves, F., Santiago de Queiroz, R.,

Coracini A., Guimaraes, T., Guedes, A., Harima, L., Cardoso, A., Mendes, M., John, V., Levin, A., Figueiredo, S. (2021). Decontamination and re-use of surgical masks and respirators during the COVID-19 pandemic. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.056>

5. Rodriguez, C., Sossa, M., Cortés, J. (2020). Decontamination and reuse of N95 filtering facemask respirators: A systematic review of the literature. *American Journal of Infection Control*, 48, 1520 – 1532. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.07.004>
6. Memarzadeh, F., Olmsted, R., Bartley, J. (2010). Applications of ultraviolet germicidal irradiation in health care facilities: Effective adjunct, but not stand-alone technology. *Am. J. Infect. Control*, 39, 13 – 24.
7. Gonzáles, M., Vernhes, M., Sánchez, A. (2009). La radiación ultravioleta. Su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. *Theoria*, 18, 69 – 80. ISSN 0717-196X.
8. Raeiszadeh, M., Adeli, B. (2020). A critical review on ultraviolet disinfection system against COVID-19 outbreak: Applicability, validation, and safety considerations. *ACS Photonics*, 1 – 11. <https://dx.doi.org/10.1021/acsp Photonics.0c01245>

9. IES Photobiology Committee. (2020). IES Committee Report: Germicidal Ultraviolet (GUV) – Frequently Asked Questions. IES Committee Report CR-2-20-V1, 1 – 24. ISBN 978-0-87995-389-8
10. Lucas, R., McMichael, T., Smith, W., Armstrong, B. (2006). Solar Ultraviolet Radiation: Global burden of disease from solar ultraviolet radiation. WHO, *Enviro. Burd. Dis. Ser.*, 13, 1 – 256. ISBN 92-4-159440-3
11. D’Orazio J., Jarrett, S., Amaro, A., Scott, T. (2013). UV radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 12222 – 12248. doi:10.3390/ijms140612222
12. Correa, M. (2015). Solar ultraviolet radiation: properties, characteristics and amounts observed in Brazil and South America. *An. Bras. Dermatol.*, 90, 297 – 313. <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20154089>
13. Villarroel, D., Romero, L., Britto, M., Ramos, A. (2015). Luz Ultravioleta: Inactivación microbiana en frutas. *SABER*, 27, 454 – 469. ISSN 2343-6468
14. Browne, K. (2021). Brought to Light: How Ultraviolet Disinfection Can Prevent the Nosocomial Transmission of COVID-19 and Other Infectious Diseases. *Appl. Microb.*, 1, 537 – 556. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol1030035>

15. Claytor, S., Campbell, R., Hattori, A., Brown, E., Hollis, C., Schureck, M., Atchley, H., Stone, J., Grady, M., Yang, B., Harris, T. (2021). Portable Ultraviolet-C Chambers for Inactivation of SARS-CoV-2. *Jour. Res. Nat. Ins. Stand. Tech.*, 126, 1 – 20.
16. Yang, J., Wu, U., Tai, H., Sheng, W. (2019). Effectiveness of an ultraviolet-C disinfection system for reduction of healthcare-associated pathogens. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 52, 487 – 493. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2017.08.017>
17. Wright, H., Cairns, W. (1996). *Luz Ultravioleta*. Trojan Tech. Inc., Canada, 1 – 34.
18. Dirección General de Investigación y Estudios sobre Comercio Exterior. (2020). *Reporte Mensual del Comercio – Julio 2020*. MINCETUR, Perú, 1 – 9.
19. Ministerio de Salud del Perú. (2022). *Norma Técnica de Salud para la Prevención y Control de la COVID-19 en el Perú. Modificación de la NTS N° 178-MINSA/DGIESP-2021*, Lima, Perú, 1 – 5.
20. Feng-Shiang, C., Yung-Feng, Y., Shu-Yi, L., Shih-Han, W., Yi-Chang, C., Dachen, C., Chu-Chieh, C., Hsiao-Yun, H. (2021). *Prevalence and Factors Associated with the Reuse of Mask during the COVID-19 Pandemic: A*

- Nationwide Survey in Taiwan. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 18, 1 – 11. . [https:// doi.org/10.3390/ijerph18158065](https://doi.org/10.3390/ijerph18158065)
21. Romani, L., Vilchez, J. (2020). Reutilización de respiradores N95: estrategias de descontaminación aplicables en la pandemia de COVID 19 en Perú. *Acta Med. Perú*, 37, 223 – 227. doi: <https://doi.org/10.35663/amp.2020.372.970>
22. Alcaraz, J., Le Coq, L., Pourchez, J., Thomas, D., Chazelet, S., Boudry, I., Barbado, M., Silvent, S., Dessale, C., Antoine, F., Guimier-Pingault., Cortella, L., Rouif, S., Bardin-Monnier, N., Charvet, A., Dufaud, O., Leclerc, L., Montigaud, Y., Laurent, C., Verhoeven, P., Joubert, A., Bouhangel, A., Andres, Y., Gaffé, J., Martin, D., Huet, C., Boisset, S., Maurin, M., Rumeau, P., Charlot, F., Richaud, E., Moreau-Gaudry, A., Bonneterre, V., Cinquin, P., Landelle, C. (2021). Reuse of medical face masks in domestic and community settings without sacrificing safety: Ecological and economical lessons from the Covid-19 pandemic. *Chemosphere*, 288, 1 – 12. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132364>
23. Instituto de Evaluación de Tecnologías en Salud e Investigación (IETSI). (2020). Métodos de descontaminación de respiradores N95 en estado de escasez (COVID19). ESSALUD, Perú, 1 – 33.

24. Nicolau, T., Gomes, N., Zille, A. (2021). Ultraviolet-C as a viable reprocessing method for disposable masks and filtering facepiece respirators. *Polymers*, 13, 801 – 824. <https://doi.org/10.3390/polym13050801>
25. Ontiveros, C., Sweeney, C., Smith, C., MacIsaac, S., Bennet, J., Munoz, S., Stoddart, A., Gagnon G. (2021). Assessing the impact of multiple ultraviolet disinfection cycles on N95 filtering facepiece respirator integrity. *Nature Scientific Reports*, 11(12279), 1 – 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91706-1>
26. Ogbuoji, E., Zaky, A., Escobar, I. (2021). Advanced Research and development of face masks and respirators pre and post the Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: A critical review. *Polymers*, 13, 1998 – 2044. <https://doi.org/10.3390/polym13121998>
27. Instituto Nacional de Calidad (INACAL). (2020). NTP 329.200: Materiales médicos. Mascarillas quirúrgicas. Requisitos y métodos de ensayo. R.D. N° 002-2020-INACAL/DN, 1 – 29.
28. American Pharmacopeia (USP). (2020), Chapters 61 – 62: Microbiological examination for non-sterile products. Ed. N° 43.
29. Corral, A., Morales, Y., Pazos, L., Ramírez, A., Martínez, R., Muñoz, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de

- “goteo en placa por sellado (o estampado) masivo”. Rev. Colomb. Biotecnol., 14, 147 – 156.
30. Setlow, B., Setlow, P. (1996). Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. *Journal of Bacteriology*, 178(12), 3486 – 3495.
 31. Trunet, C., Carlin, F., Coroller, K. (2017). Investigating germination and outgrowth of bacterial spores at several scales. *Trends in Food Sci. Tech.*, 64, 60 - 68. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.03.008
 32. De Farias, V., Monteiro, K., Rodrigues, S., Narciso, F., Saavedra, G. (2010). Comparison of *Aspergillus niger* spore production on Potato Dextrose Agar (PDA) and crushed corncob medium. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 56, 399 – 402.
 33. Tsukahara, T., Yamada, M., Itagaki, T. (1966). Micromorphology of Conidiospores of *Aspergillus niger* by electron microscopy. *Japan. J. Microbiol.*, 10, (2), 93 – 107.
 34. Bayliss, C., Waites, W., King, N. (1981). Resistance and Structure of Spores of *Bacillus subtilis*. *Jour. App. Microbiol.*, 50, 379 – 390.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1981.tb00901.x>

35. Ramos, C., Roque, J., Sarmiento, D., Suarez, L., Sunio, J., Tabungar, K., Tengco, G., Rio, P., Hilario, A. (2020). Use of ultraviolet-C in environmental sterilization in hospitals: A systematic review on efficacy and safety. *International Journal of Health Sciences*, 14(6), 52 – 65.
36. Casini, B., Tuvo, B., Cristina, M., Spagnolo, A., Totaro, M., Baggiani, A., Privitera, G. (2019). Evaluation of an ultraviolet C (UVC) light-emitting device for disinfection of high touch surfaces in hospital critical areas. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 16, 1 – 10. doi:10.3390/ijerph16193572
37. Xiang, Y., Song, Q., Gu., W. (2020). Decontamination of surgical face masks and N95 respirators by dry heat pasteurization for one hour at 70°C. *Am. J. Infect. Control*, 48, 880 – 882. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.05.026>
38. Delanghe, L., Cauwenberghs, E., Spacova, I., De Boeck, I., Van Beeck, W., Pepermans, K., Claes, I., Vandenheuvel, D., Verhoeven, V., Lebeer, S. (2021). Cotton and surgical face masks in community settings: Bacterial contamination and Face Mask Hygiene. *Front. Med.*, 8, 1 – 12. doi: 10.3389/fmed.2021.732047
39. Chen, P., Yang, L., Wang, L., Zhang, B. (2006). Chapter 10: Ultraviolet Radiation for Disinfection. From: *Handbook of Environmental Engineering*, 4: 1 – 49.

40. Poster, D., Hardwick, M., Miller, C., Riley, M., Rodrigo, S., Vladar, A., Wright, J., Zangmeister, C., Zarobila, C., Starkweather, J., Wynne, J., Yilzarde, J. (2021). Disinfection of Respirators with Ultraviolet Radiation. *Jour. Res. Nat. Inst. Stand. Tech.*, 126, 1 – 29.
41. D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., Scott, T. (2013). UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 12222 – 12248. doi:10.3390/ijms140612222
42. Epelle, E., Macfarlane, A., Cusack, M., Burns, A., Okolie, J., Mackay, W., Rateb, M., Yaseen, M. (2023). Ozone application in different industries: A review of recent developments. *Chemical Engineering Journal*, 454, 1 – 21. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140188>
43. O’Hearn, K., Gertsman, S., Sampson, M., Webster, R., Tsampalieros, A., Ng, R., Gibson, J., Lobos, A., Acharya, N., Agarwal, A., Boggs, S., Chamberlain, G., Staykov, E., Sikora, L., McNally, J. (2020). Decontaminating N95 and SN95 masks with ultraviolet germicidal irradiation does not impair mask efficacy and safety. *Journal of Hospital Infection*, 106, 163 – 175. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.07.014>
44. Van der Vossen, J., Fawzy, A., Ouwens, A., Van Doormalen, J., de Samber, M., Driessens, R., Heerikhuisen, M., Montijn, R. (2022). Effective ultraviolet C light disinfection of respirators demonstrated in challenges

- with *Geobacillus stearothermophilus* spores and SARS-CoV-2 virus. J. Hosp. Infect., 122, 168 – 172. doi: [10.1016/j.jhin.2022.01.021](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.01.021)
45. Gayán, E., Álvarez, S., Condón, S. (2013). Inactivation of bacterial spores by UV-C light. Inn. Food Sci. Emerg. Tech., 19, 140 – 145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.04.007>
46. Ozer, G., Uyar, B. (2019). Effects of ethanol and ultraviolet-c treatments on inactivation of *Rhizopus oryzae* spores which cause postharvest rot. Food Sci. Tech., 39, (3), 691 – 695. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.04618>
47. Jung, J., Lee, J. (2021). Effects of Heating and UV Sterilization of Repeatedly Reused Face Masks on Inhalation Resistance and Fiber Structure. Fashion and Text. Res. J., 23 (3); 406 – 414. <https://doi.org/10.5805/SFTI.2021.23.3.406>
48. Liu, X., Cao W., Xie, L., Sun, C., Jiang, F. (2022). Photoaging Characteristics of Disposable Masks under UV Irradiation. J. Mar. Sci. Eng., 10 (170): 1 – 10. <https://doi.org/10.3390/jmse10020170>

X. ANEXOS

Anexo 1

Esquema de trabajo para la obtención de inóculos bacterianos

Para el caso de las bacterias que no producen esporas se obtendrán los inóculos mediante diluciones sucesivas (Corral, A. *et al* 2012). El inóculo a utilizar debe ser de 10 – 100 ufc/mL.



Anexo 2. Esquema de trabajo para la obtención de esporas a partir de cepas certificadas

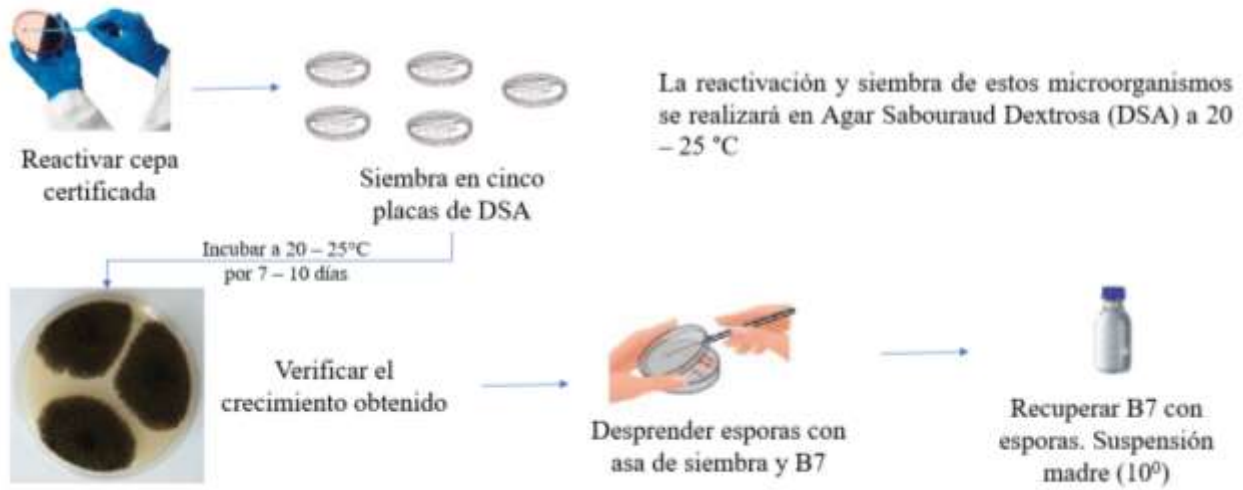
Bacillus subtilis ATCC 6633

La obtención de esporas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, se realizará según Nicholson, W. *et al* 2003. El inóculo a utilizar debe ser de 10 – 100 ufc/mL, obtenido luego de reactivar las esporas. La reactivación y siembra de las esporas se realizará en medio de esporulación 2x Schaeffer-Glucosa (2xSG) a 37°C.



Aspegillus brasiliensis ATCC 16404

Para las esporas de *Aspegillus brasiliensis* ATCC 16404 se obtendrán de acuerdo a De Farias, V. *et al* 2010. El inóculo final a utilizar debe ser de 10 – 100 ufc/mL luego de reactivar las esporas.



Anexo 3

Conteo de inóculos bacterianos y esporas obtenidas por diluciones sucesivas

Cepas	Placa	Conteo por diluciones (UFC/mL)										
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	1	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	458	41	5	0
	2	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	465	45	7	1
	3	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	487	39	4	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	1	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	247	25	2	0
	2	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	233	27	5	0
	3	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	214	25	4	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	368	33	3	1
	2	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	341	38	8	0
	3	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	333	45	7	1
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	257	29	2	0	0
	2	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	247	33	1	1	0
	3	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	266	28	1	0	0
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	1	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	192	14	0	0	0
	2	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	185	16	0	0	0
	3	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	MNPC	179	18	1	0	0

*MNPC: Muy numeroso para contar

Anexo 4

Recuperación del crecimiento microbiano después de la desinfección de fragmentos de mascarillas

Cepas	Repetición	Conteo según tiempo de exposición a UV (UFC)				
		Control (Sin UV)	1.5 min	2 min	5 min	10 min
Control (Sin inóculo)	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	1	39	7	0	0	0
		41	12	0	0	0
		32	8	0	0	0
	2	35	5	0	0	0
		34	5	1	0	0
		39	8	0	0	0
	3	44	6	1	0	0
		38	9	0	0	0
		42	10	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	1	29	4	1	0	0
		28	4	0	0	0
		32	1	0	0	0
	2	27	2	0	0	0
		29	4	0	0	0
		24	4	0	0	0
	3	22	8	0	0	0
		29	7	0	0	0
		28	3	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1	35	10	0	0	0
		42	4	0	0	0
		39	9	0	0	0
	2	45	12	1	0	0
		33	7	0	0	0

		41	11	0	1	0
	3	38	6	0	0	0
		33	4	1	0	0
		36	5	1	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1	21	2	0	0	0
		26	5	0	0	0
		24	5	0	0	0
	2	31	2	0	0	0
		28	4	0	0	0
		22	3	0	0	0
	3	26	6	0	0	0
		24	2	0	0	0
		29	5	0	0	0
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	1	19	1	0	0	0
		24	0	0	0	0
		17	0	0	0	0
	2	19	1	0	0	0
		20	0	0	0	0
		17	0	0	0	0
	3	18	4	0	0	0
		14	0	1	0	0
		21	2	0	0	0