

Acción germicida *in vitro* de productos desinfectantes de uso en la industria de alimentos

Luis López V, José Romero R y Fernando Ureta V.

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Santiago de Chile

RESUMEN.

Existe en el mercado una gran variedad de productos desinfectantes de uso tradicional en la industria alimentaria, como cloro, yodo, amonios cuaternarios y sus respectivos derivados. Sin embargo, han aparecido otros productos alternativos, como el extracto de semilla de toronja, ácido peracético y láctico. En el presente trabajo se analizó la efectividad germicida *in vitro* del extracto de semilla de toronja (400 ppm), ácido peracético (2000 ppm) y ácido láctico (20000 ppm) a los tiempos recomendados por el fabricante y otros tiempos adicionales, frente a microorganismos de prueba, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Para cada caso se determinó la cinética de muerte, evaluando la eficacia germicida (%), la velocidad específica de muerte (t^{-1}) y el tiempo de reducción decimal (min). De los productos evaluados, el ácido peracético en las condiciones recomendadas por el fabricante, 2000 ppm durante 1 min de acción, presentó los menores tiempos de reducción decimal frente a los microorganismos ensayados. En general y para todos los productos, los microorganismos Gram positivos presentaron una mayor sensibilidad a la acción desinfectante.

Palabras clave: Desinfectantes, acción germicida, alimentos.

SUMMARY.

In vitro germicide action of disinfectant products used in the food industry. There is a wide offer of disinfectant products, for the food industry, available in the market, such as chlorine, iodine and quaternary ammonium compounds and their respective derivatives. However, new alternative products have emerged, for instance grapefruit seed extract, and peracetic and lactic acids. The present study was carried out in order to analyze *in vitro* the germicide effect, from the grapefruit seed extract (400 ppm), peracetic acid (2000 ppm) and lactic acid (20000 ppm) at the manufacturer recommended action time, and other additional times. The germicide effect was tested against microorganisms such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa*. In each case, the death kinetic was determined through the evaluation of the germicide effect (%), specific death rate (t^{-1}) and the decimal reduction time (min). From the evaluated products, the best germicidal effect at the manufacturer conditions was reached by peracetic acid (2000 ppm) at 1 min, which presented the lower decimal reduction times compared with the other tested microorganisms. Generally speaking, Gram positive microorganisms showed a greater sensibility to the disinfectant action.

Key words: Disinfectant, germicide action, foods.

Recibido; 04-12-2000 Aceptado: 04-01-2002

INTRODUCCION

La mayoría de las plantas elaboradoras de alimentos son diseñadas para ser higiénicas, pero si no se utilizan métodos adecuados de sanitización, los alimentos pueden presentar contaminación microbiológica. Esos microorganismos pueden causar alteración en los alimentos o problemas a la salud de los consumidores (1).

De acuerdo a estudios realizados por el Food and Drug Administration (FDA), respecto a enfermedades transmitidas por alimentos, una de las principales causas de este problema en Estados Unidos, es la sanitización no adecuada de superficies y utensilios para la preparación de alimentos, incluyendo tablas para cortar y cuchillos. Cada año en ese país, alrededor de 33 millones de personas sufren de enfermedades transmitidas por alimentos, de las cuales 9.000 mueren.

El reporte del FDA revela que el 70% de los restaurantes monitoreados, no realiza una sanitización efectiva del equipo y superficies de trabajo (2).

Existe una gran oferta de productos detergentes y desinfectantes, que en conjunto con adecuados programas de sanitización, ayudarían a prevenir y reducir la contaminación microbiológica. Entre estos se encuentran 3 productos de interés actual, el extracto de semilla de toronja, compuesto complejo, físicamente estabilizado e integrado por elementos naturales y que ha sido aprobado de acuerdo al registro del FDA, USA N° 0013982 (3); el ácido peracético, líquido transparente que se descompone formando agua y ácido acético, no afectando a los alimentos, aprobado por FDA N° 84F0099 (4) y el ácido láctico, que es un líquido viscoso, claro, levemente amarillento y completamente soluble en agua (5).

Por ser estos productos de naturaleza ácida, su acción germicida es atribuible a que afectan el pH del medio, desnaturalizan las proteínas y afectan el funcionamiento de la membrana celular (1,6).

En comparación con los yodóforos y derivados de cloro, estos compuestos ácidos no se ven afectados por la temperatura, son más estables al almacenamiento, no son corrosivos, no son tóxicos y pueden ser usados en la mayoría de las superficies en que se procesan productos alimenticios. Así también presentan ventajas sobre los amonios cuaternario, ya que son menos afectados por la materia orgánica y los detergentes (1).

Estos productos ya están siendo aplicados en diferentes ámbitos de la industria de alimentos, considerando para ello sólo las especificaciones técnicas que entregan sus distribuidores, sin efectuar en la mayoría de los casos una validación experimental adecuada del efecto esperado.

En el presente trabajo se comparó la acción *in vitro* que ellos presentan, frente a microorganismos Gram (+) (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*) y Gram (-) (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), representativos de la flora contaminante que puede estar presente en la mayoría de las industrias elaboradoras de alimentos.

MATERIALES Y METODOS

Los productos desinfectantes se estudiaron a la concentración de uso y tiempo de acción (*) recomendados por el fabricante y a otros tiempos adicionales:

Extracto de semilla de toronja (A), 400 ppm y a 3, 5 y 10 (*) min de acción

Acido peracético (B), 2000 ppm y a 0,5, 1(*) y 2 min de acción

Acido láctico (C), 20000 ppm y a 1, 3 y 5 (*) min de acción

Los microorganismos utilizados fueron cepas de colección:

Staphylococcus aureus ATCC 6538 *Escherichia coli* ATCC 25922

Streptococcus faecalis ATCC 33186 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro*

Cada experiencia se realizó por triplicado y los resultados corresponden al promedio de los valores obtenidos.

Se prepararon los desinfectantes de acuerdo a las especificaciones del fabricante, utilizando agua potable 300 ppm CaCO₃ de dureza y a temperatura ambiente (15°C).

El inóculo bacteriano se preparó, haciendo crecer las cepas durante 24 h en caldo nutritivo a una temperatura de 35°C.

La determinación de la actividad antimicrobiana propiamente tal, se efectuó de acuerdo a la metodología recomendada por AOAC (7), poniendo en contacto los microorganismos en concentraciones de 10⁷ ufc/ml con los productos en estudio, sacando alícuotas de la suspensión a los tiempos establecidos y efectuando el recuento de los microorganismos sobrevivientes. Este último y el recuento inicial de las cepas, se realizó en Agar Nutritivo con incubación a 35°C por 24 h.

Los resultados se expresaron como eficiencia germicida porcentual (% E), velocidad específica de muerte (k) y tiempo de reducción decimal (TRD).

El valor de %E se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia (\%)} = N_0 - N_t \times 100$$

$$N_0$$

donde N_0 = número de microorganismos iniciales

N_t = número de microorganismos sobrevivientes a tiempo t

La velocidad específica de muerte k corresponde a la pendiente de la curva en el gráfico $\ln N_t$ vs t y se obtiene a partir de la siguiente expresión matemática:

$$\ln(N_t/N_0) = -kt$$

donde N_0 = numero de microorganismos iniciales

N_t = número de microorganismos sobrevivientes a tiempo t

t = tiempo de contacto entre el desinfectante y el microorganismo

k = velocidad específica de muerte (t^{-1})

El TRD queda determinado por:

$$\text{TRD} = 2,3/k$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tres productos ensayados son de naturaleza ácida, constituidos en base a ácido ascórbico (producto A), ácido peracético (producto B) y ácido láctico (producto C).

A las concentraciones y tiempos recomendados para cada producto, se evidencia de acuerdo a las velocidades específicas de muerte y tiempos de reducción decimal calculados (Tabla 1 y 2), una acción más eficaz en el siguiente orden: producto B ? producto C ? producto A.

TABLA 1

Velocidades específicas de muerte, k (min^{-1}) a los tiempos y concentraciones recomendados por el fabricante

Producto/tiempo	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
A / 10 min	1,82	1,26	1,40	1,02
B / 1 min	5,42	5,31	4,45	4,44
C / 5 min	2,62	2,08	2,10	2,04

TABLA 2

Tiempo de reducción decimal, TRD (min) a los tiempos y concentraciones recomendados por el fabricante

Producto/tiempo	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
A / 10 min	1,27	1,83	1,65	2,26
B / 1 min	0,42	0,43	0,52	0,52
C / 5 min	0,88	1,11	1,10	1,13

Cada desinfectante, muestra una acción germicida similar frente a cada uno de los microorganismos probados, las variaciones más significativas en la velocidad específica de muerte, se presenta para el producto B, $k = 5,42 \text{ min}^{-1}$ para *S. aureus* y $k = 4,44 \text{ min}^{-1}$ para *P. aeruginosa*.

En general para los productos ensayados, *P. aeruginosa* presentaría la mayor resistencia y *S. aureus* la menor resistencia a la acción

germicida.

Al comparar la acción desinfectante de cada producto, expresada como % Eficacia germicida (Tabla 3) se observa que en ningún caso se alcanza la reducción estipulada por el test de Chambers, el cual considera como buen desinfectante un producto que, a la concentración recomendada, cause un 99,999% de muerte a una cantidad entre $7,5 \times 10^7$ y $1,3 \times 10^8$ células / ml en 30 seg (8).

TABLA 3

Eficacia (%) de los productos desinfectantes a las concentraciones de uso recomendadas y diferentes tiempos de acción

Tiempo (min)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>P. Aeruginosa</i>
Producto A	98,629	96,071	99,973	94,194
3	99,999	99,993	99,999	99,972
5	99,999	99,999	99,999	99,996
10*				
Producto B	94,722	93,846	95,098	90,333
0,5	99,556	99,508	98,824	98,833
1*	99,999	99,996	99,999	99,992
2				
Producto C	99,750	77,966	96,938	84,615
1	99,998	99,932	99,969	99,773
3	99,999	99,997	99,997	99,996
5*				

*tiempo recomendado por el fabricante

El 99,999 % de reducción se logra con el producto A frente a *S. aureus*, *E. coli* y *S. faecalis* sólo a los 10 min de acción.

Con el producto B, frente a *S. aureus* y *S. faecalis* esto se logra a los 2 min y con el producto C sólo para *S. aureus* a los 5 min.

Las condiciones de empleo indicadas por los respectivos fabricantes, para cada uno de los productos ensayados, son bastante diferentes, en cuanto a concentración y tiempos de acción. Además, se debe considerar que en el cálculo de Eficacia germicida (%), no se considera el tiempo, es decir se puede presentar la misma Eficacia pero a tiempos muy distintos.

El ácido peracético, además por ser un poderoso oxidante, oxida los grupos sulfhidrilos y grupos amino de las moléculas de aminoácidos. Esto explicaría la acción más eficaz del producto B, en las condiciones ensayadas.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En las condiciones del ensayo y de acuerdo al tiempo de reducción decimal y la velocidad específica de muerte, el producto de mayor efectividad resultó ser el ácido peracético.

En ningún caso se alcanzó la exigencia del Test de Chambers. El 99,999% de destrucción se obtuvo a los 10 min frente a *S. aureus*, *E. coli* y *S. faecalis* para el producto A; con el producto B a los 2 min de acción frente a *S. aureus* y *S. faecalis* y con el producto C, solamente frente a *S. aureus* a los 5 min de acción.

La mayor sensibilidad a estos compuestos la presentaron los microorganismos Gram positivos.

A objeto de mejorar la acción de estos productos se podría recomendar aumentar la concentración en el caso del producto A y un mayor tiempo de exposición a los productos B y C.

REFERENCIAS

1. Marriott, N.G. Essentials of Food Sanitation. Chapman & Hall. International Thomson Publishing. 1997.
2. Flynn, J.F. FDA Study Declares Unsanitized Food Preparation Surfaces and Equipment Among the Greatest Risks of Foodborne Illness. Chlorine Chemistry Council. 2000.
3. Chemie Research. Kilol. Catálogo Informativo. Santiago 1994.
4. Prinal. El desinfectante Oxonia activo. Catálogo Informativo. Santiago 1994.
5. Cramer S.A.I.C. Acido láctico. Catálogo Informativo. Santiago 1996.
6. McDonnell, G. y Russell, A.D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. Clin. Microbiol. Rev. 12 (1):147-179. 1999.
7. AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 12th Ed. Washington. 1984.
8. Ayres, J.C.; Mundt, J.O. y Sandine, W.E. Microbiology of Foods. San Francisco: W.H. Freeman & Co. 1980.