



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA APLICADA

**“Efecto bactericida de desinfectantes
sobre cepas de *Escherichia coli* y *Listeria
innocua* en superficies de uso en la
Industria Alimentaria”**

José Romero Reyes

Patrocinante y Director

Químico (UCH)

Luis López Valladares

Director

Químico Farmacéutico (UCH)

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

Jennifer Sabrina Herrera Zúñiga

Santiago, Chile

2016

Este trabajo se lo dedico a todas las personas que pasaron por mi vida y me dieron su apoyo y palabra de aliento, su abrazo, cariño y fuerza para que se lograra el objetivo de ser una gran profesional.

Agradecimientos

Agradezco primero que todo a mis padres, que han puesto todo su esfuerzo y sacrificio en entregarme todo lo que he necesitado para poder llegar a ser una profesional, agradezco además a mi familia, por estar siempre, por el apoyo incondicional en los momentos difíciles y por confiar siempre en mí.

A mis amigos y compañeros con quienes compartimos horas y horas de estudio, traspasos y por sobre todo risas y buenos momentos durante estos años de Universidad, gracias por todo.

A Rodrigo, por tu paciencia y apoyo constante que han sido muy importantes para mí.

A cada uno de los profesores y sobre todo mis profesores Directores de memoria, por guiarme, enseñarme y por su buena disposición para ayudar siempre.

A la empresa PRINAL, por su colaboración que fue de gran ayuda en el desarrollo del presente trabajo.

A cada uno de las personas, que gracias a su labor han contribuido en el logro de este objetivo, muchas gracias.

Índice	Página
I. Resumen.....	5
II. Abstract.....	7
III. Introducción.....	9
IV. Hipótesis.....	12
V. Objetivos.....	12
1. Objetivo general.....	12
2. Objetivos específicos.....	12
VI. Materiales y Métodos.....	13
1. Materiales.....	13
1.1. Insumos.....	13
1.2. Equipos.....	14
2. Métodos.....	14
2.1. Recuento inicial de cepas.....	14
2.2. Determinación de la CMI.....	14
2.3. Determinación de la CMB.....	14
2.4. Determinación de la acción bactericida <i>in vivo</i> de los desinfectantes.....	15
2.5. Velocidad específica de muerte.....	15
2.6. Eficiencia germicida.....	16
2.7. Tiempo de reducción decimal.....	16
2.8. Coeficiente de dilución (η).....	17
2.9. Análisis estadístico.....	17
VII. Resultados.....	18
1. Determinación CMI.....	18
2. Determinación CMB.....	19
3. Acción bactericida <i>in vivo</i> de los desinfectantes sobre las cepas en estudio y resumen de velocidades específicas de muerte (k), valores de eficiencia, tiempo de reducción decimal.....	21

3.1.	Acción de desinfectantes probada en acero inoxidable.....	21
3.1.1.	Acción de desinfectante A sobre <i>Escherichia coli</i>	21
3.1.2.	Acción de desinfectante A sobre <i>Listeria innocua</i>	23
3.1.3.	Acción de desinfectante B sobre <i>Escherichia coli</i>	25
3.1.4.	Acción de desinfectante B sobre <i>Listeria innocua</i>	27
3.2.	Acción de desinfectantes probada en plancha de PEHD	29
3.2.1.	Acción de desinfectante A sobre <i>Escherichia coli</i>	29
3.2.2.	Acción de desinfectante A sobre <i>Listeria innocua</i>	31
3.2.3.	Acción de desinfectante B sobre <i>Escherichia coli</i>	33
3.2.4.	Acción de desinfectante B sobre <i>Listeria innocua</i>	35
4.	Valores de coeficiente de dilución (η).....	37
VIII.	Discusiones.....	38
IX.	Conclusiones.....	47
X.	Bibliografía.....	49

I. Resumen

Actualmente existe una gran oferta de productos desinfectantes que han enfocado su uso en la industria alimentaria para llevar a cabo de forma adecuada, programas de limpieza y desinfección, con el fin de reducir y en ciertos casos eliminar los microorganismos de la infraestructura que está en contacto con la línea de producción alimentaria. De esta forma se busca inhibir el peligro de contaminación y se garantiza un producto inocuo. Sin embargo la mayoría de los estudios con desinfectantes se realizan *in vitro*, no considerando los factores ambientales reales de contaminación. Es por esto que se realizó un análisis directamente en superficies ampliamente utilizadas en la industria como es el caso de acero inoxidable y plancha de polietileno de alta densidad (PEHD, por sus siglas en inglés) probando la acción bactericida de dos productos desinfectantes comercializados actualmente. El producto A compuesto por glutaraldehído y amonios cuaternarios y el producto B por ácido peracético, peróxido de hidrógeno y ácido acético. Las pruebas se realizaron a distintos tiempos y en las concentraciones indicadas por el fabricante. Para cada producto se determinó la concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida, la cinética de muerte de los microorganismos, porcentaje de eficiencia, constante específica de muerte (k), tiempo de reducción decimal (TRD) y el coeficiente de dilución. Estos análisis se realizaron frente a dos microorganismos, un Gram positivo y un Gram negativo como lo son *Listeria innocua* y *Escherichia coli* respectivamente.

Los resultados obtenidos mostraron que el desinfectante A fue más eficiente que el desinfectante B, en la máxima concentración recomendada por el fabricante (0,5%) a los 5 min, logrando la disminución de al menos 6 ciclos logarítmicos, mientras que el producto B a una concentración de 0,8% logró disminuir entre 4 y 6 ciclos. Lo mismo ocurrió con las concentraciones mínimas recomendadas, donde el producto A al 0,25% logró bajar de 2 a 4 ciclos mientras que el desinfectante B solo disminuyó la carga bacteriana entre 1 y 3 ciclos logarítmicos.

Fue posible determinar también a través de los valores de k y TRD, que *Listeria innocua* fue menos resistente que *Escherichia coli* frente a ambos productos evaluados, mientras que al comparar entre superficies no se encontraron diferencias entre la acción germicida sobre acero inoxidable y plancha de PEHD.

II. Abstract

“Disinfectants bactericidal effect on strains of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on food industry surfaces”.

Currently exists a big range of disinfectants products which has been focused its use in the Food Industry, in order to carry on cleaning and disinfection programs, with the aim to reduce and in certain cases eliminate microorganisms of the surfaces and all infrastructures what is in contact with the food production line. Thereby is sought to inhibit the contamination hazard and ensure a food safety. However, most of the disinfectants studies are done *in vitro*, without considering the environmental factors. Is that why it was done analysis directly performed on the most common and widely used surfaces in the Food Industry such as stainless steel and polyethylene high-density (PEHD), testing the bactericidal action of two currently marketed disinfectants. The product A, composed by glutaraldehyde and quaternary ammonium compounds as well as the product B, composed by peracetic acid, hydrogen peroxide and acetic acid. The tests were carried out at different times and at the concentrations indicated by the manufacturer. It was possible to determine the minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration, the kinetic death of microorganisms, efficiency percentage, the specific constant of death k , decimal reduction time (DRT) and diffusion coefficient. These analyses were done with two microorganisms, one Gram-positive and one Gram-negative as are *Listeria innocua* and *Escherichia coli*, respectively.

The results obtained showed disinfectant A was more efficient than disinfectant B, with the maximum concentration recommended by the manufacturer (0,5%) at 5 min, achieving the reduction of at least 6 log cycles, while the product B at a concentration of 0,8% was possible to reduce between 4 and 6 log cycles. The same occurred with minimum indicated concentrations, since A at 0,25% reduced between two to four log cycles, while the disinfectant B just reduced the microbial load between 1 to 3 log cycles.

It was possible to determine as well, through the k and DRT values that *Listeria innocua* was less resistant than *Escherichia coli* against both disinfectants, whereas by comparing the bactericidal action between both surfaces, no differences were found between PEHD and stainless steel surfaces.

III. Introducción

La industria de alimentos debe lidiar a diario con una gran problemática como son las ETAs (Enfermedades Transmitidas por los Alimentos), lo que impacta económicamente al sector productivo, ya que produce una serie de reacciones partiendo por reclamos y devoluciones, seguido por el retiro y destrucción de toneladas de producto, pérdida de confianza del comprador por la calidad de los productos, demandas, sanciones regulatorias, cierre de plantas o fábricas, desprestigio de la marca lo que finalmente conlleva a significativas pérdidas de ingresos para la industria alimentaria. Estas ETAs, están generalmente asociadas a la presencia de bacterias patógenas y sus toxinas que se encuentran presentes en los alimentos al momento de procesarlos o se contaminan durante esta etapa (ACHIPIA, 2013).

EL problema se genera por la supervivencia de microorganismos patógenos o de alteradores debido a una desinfección insuficiente de las superficies o de los instrumentos en contacto con los alimentos (Carpentier y Cerf, 1993; Fuster I Valls, 2006).

Estos microorganismos patógenos forman biofilms adhiriéndose en cualquier tipo de superficie, incluyendo plástico, cristal, madera, metal y sobre los alimentos (Chmielewsky y Frank, 2003).

Los biofilms son comunidades complejas de microorganismos que crecen embebidos en una matriz orgánica polimérica autoproducida y adherida a una superficie viva o inerte, y que pueden presentar una única especie microbiana o un abanico de especies diferentes (Carpentier y Cerf, 1993).

Puesto que estas formaciones pueden contener microorganismos patógenos y presentan una mayor resistencia a la desinfección, se incrementan las probabilidades de contaminación del producto, razón por la que se considera que la presencia de biofilms en las superficies de contacto de la industria alimentaria constituye un evidente peligro para la salud de los consumidores, lo que conlleva a

altos costos tanto en salud pública como para la industria alimentaria que debe responder y hacerse cargo de este tipo de problemáticas.

Los biofilms formados sobre alimentos y en superficies, utillaje e instrumentos aumentan considerablemente los problemas de contaminación cruzada y de contaminaciones posteriores en el procesado. Por este motivo es preciso eliminar todos los microorganismos de las superficies en contacto con los alimentos, antes de que los contaminen y establezcan un biofilm que les servirá de reservorio (Fuster I Valls, 2006).

Aunque la normativa Chilena no exige un control microbiológico de superficies en el sector alimentario, con el tiempo se ha ido reconociendo la importancia de verificar los procedimientos de limpieza y desinfección así como la acción de los desinfectantes utilizados. El objetivo de los programas de limpieza y desinfección es reducir, y en ciertos casos eliminar la carga bacteriana de toda la infraestructura que se ponga en contacto con la línea de producción alimentaria. De esta forma se busca inhibir el peligro de contaminación cruzada para garantizar un producto inocuo. Es por esto que se genera la necesidad de adoptar programas de sanitización de superficies mediante el uso de desinfectantes además de métodos de control y vigilancia que permitan verificar su eficacia de forma rápida y precisa mediante técnicas tradicionales (Fuster I Valls, 2006).

Los desinfectantes son agentes químicos que destruyen o inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos en fase vegetativa o no esporulada. Los desinfectantes no necesariamente eliminan a la totalidad de los organismos, pero generalmente los reducen a un nivel que no dañan la salud del consumidor ni la calidad de los productos. Ningún procedimiento de desinfección puede ser totalmente eficaz si no va precedido de una cuidadosa limpieza. Un factor muy importante a tener en cuenta es la rotación de los productos empleados, pues el uso continuado de un mismo producto puede dar lugar a la selección de microorganismos resistentes al mismo.

Los desinfectantes se aplican sobre objetos materiales inertes como instrumentos y superficies con el fin de tratar o prevenir la infección (OMS, 2015). Según la FDA (Food and Drug Administration) un desinfectante de alto nivel es un compuesto sintético que depositado sobre material vivo o inerte, destruye en 10 a 15 min todos los gérmenes patógenos tales como bacterias, hongos y virus excluyendo el virus de la hepatitis B (Martínez y cols, 2013).

Existe una gran variedad de agentes desinfectantes que son utilizados para destruir a los microorganismos y difieren de gran forma en sus propiedades. La mayoría de las veces los productos comerciales están compuestos de mezclas de agentes desinfectantes, esta técnica es muy usada para abarcar un mayor espectro de microorganismos (por ejemplo Gram+ y Gram-, esporas, mohos y levaduras, virus). Es posible mencionar varios tipos de desinfectantes utilizados en la industria alimentaria, entre ellos hipocloritos, desinfectantes yodados, compuestos de amonio cuaternario, tensioactivos anfotéricos, compuestos fenólicos, ácidos y álcalis fuertes entre otros.

La elección de un desinfectante no siempre es fácil, en ciertos tipos de aplicación el desinfectante debe tener una acción selectiva, para respetar cierta flora específica de maduración de algunos productos tales como quesos, yogures y otros fermentados. En otros casos se debe buscar una acción más orientada hacia los microorganismos patógenos o alterantes (Limpieza y Desinfección, 2015).

El presente estudio tiene como finalidad el realizar pruebas de eficacia de desinfectantes en superficies de uso en la industria alimentaria, para comprobar que las indicaciones dadas por el fabricante, en cuanto a concentración y tiempo de acción, cumplen los requerimientos para la disminución y/o eliminación de la carga bacteriana.

IV. Hipótesis

Los desinfectantes utilizados en la industria alimentaria, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, reducen o eliminan la carga bacteriana presente en superficies de trabajo minimizando el peligro de contaminación de los alimentos.

V. Objetivos

1. Objetivo General

Comprobar el efecto bactericida de dos desinfectantes, en superficies de trabajo utilizadas en la industria alimentaria.

2. Objetivos Específicos

Determinar y comparar la acción bactericida de los productos A y B frente a cepas de *L. innocua* (Gram+) y *E. coli* (Gram-).

Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (C.M.I.) y Concentración Mínima Bactericida (C.M.B.) para ambos microorganismos y desinfectantes en estudio.

Cuantificar *in vivo* la eficiencia germicida de ambos desinfectantes en superficies de acero inoxidable y plancha de PEHD usadas en la industria de alimentos, a diferentes tiempos y en los rangos de concentración recomendados por el fabricante.

Determinar la cinética de muerte (velocidad específica de muerte, tiempo de reducción decimal) de ambas cepas frente a cada producto y el coeficiente de dilución.

VI. Materiales y Métodos

1. Materiales

1.1. Insumos

Lámina de acero inoxidable AISI 316L sanitario

Plancha de polietileno de alta densidad natural (PEHD, por sus siglas en inglés)

Cepas de *Escherichia coli* y *Listeria innocua*

Desinfectante A: Alquil dimetil bencil amonio	17% (tensioactivo)
Glutaraldehido	11%
Isopropanol	15%
Cloruro de didecildimetilamonio	8% (tensioactivo)

Desinfectante B: Peróxido de hidrógeno	20%
Ácido peracético	5%
Ácido acético	10%
Agua	65%

Medios de cultivo: Agar tripticasa de soya (TSA)
Caldo de soya tríptico (TSB)

Neutralizante Universal:

- Tween 80 30ml/100ml
- NaHSO₃ 6,25ml (40%)
- Na₂S₂O₃ 3,92g
- Diluyente c.s.p. 250ml:
 - Peptona 1g
 - NaCl 8,5g
 - H₂O 1000ml

1.2. Equipos

Autoclave

Cámara de Flujo Laminar

Estufa de incubación 35°C ± 1°C

Agitador Vortex

Otros equipos y materiales de trabajo en Laboratorio de Microbiología Aplicada.

2. Métodos

2.1. Recuento inicial de las cepas.

La cuantificación se realizó por el método de conteo en placa Petri. Para ello se sembró *Escherichia coli* y *Listeria innocua* en agar TSA. En cada caso las placas se incubaron a 35°C durante 24 h (Arriagada, 2006).

2.2. Determinación de la CMI.

La CMI se determinó inoculando las cepas en estudio en tubos con caldo TSB y diferentes concentraciones de desinfectante. Luego de incubar a 35°C durante 24-48 h, se observó en los tubos sembrados el crecimiento de la bacteria a través de la presencia de turbidez. La CMI corresponde a la concentración de desinfectante en el primer tubo en que no se observó crecimiento bacteriano (Horna *et al*, 2005). La medición se realizó en duplicado.

2.3. Determinación de la CMB.

Se realizó a partir de los tubos utilizados en la determinación de la CMI, en los cuales no se observó crecimiento bacteriano después de la incubación. Se realizó el traspaso del cultivo, con asa a la superficie de placas con agar TSA. Estas placas se incubaron a 35°C durante 24-48 h para posteriormente observar

desarrollo o ausencia de colonias. El desarrollo de colonias indica que esa concentración corresponde a la CMI y la ausencia de colonias determinó que es la CMB (Horna *et al*, 2005). La medición se realizó en duplicado

2.4. Determinación de la acción bactericida *in vivo* de los desinfectantes

Un área determinada de las superficies en estudio, se impregnó diseminando de forma homogénea una suspensión de microorganismos de concentración conocida. Luego se incorporó el desinfectante por toda el área delimitada usando el método de aspersion, tomando muestras de áreas previamente demarcadas en tiempos de 5, 10, 20 y 30 min además de la medición inicial, de acuerdo al método de la tórula (ISO 17604:2009). Las tóruas se depositaron en tubos con 9 ml de neutralizante y se llevaron a agitación durante 1 min, realizando posteriormente las diluciones necesarias para efectuar los recuentos de los microorganismos sobrevivientes. Se inoculó 1 ml de cada dilución en placas de Petri a las que se adicionó agar TSA. Luego de incubar las muestras a 35°C por 24-48 h, se efectuó el recuento correspondiente, comprobando de esa forma la acción del desinfectante (Figueroa *et al*, 2004).

Todas las mediciones se realizaron en triplicado, los resultados se expresaron como la media entre ellos.

2.5. Velocidad específica de muerte

La cinética de muerte de los microorganismos se expresa de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\ln\left(\frac{N_f}{N_0}\right) = -kt$$

Dónde:

N_0 = número de microorganismos iniciales.

N_f = número de microorganismos sobrevivientes al tiempo t.

t = tiempo de contacto entre el desinfectante y el microorganismo.

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

2.6. Eficiencia Germicida (E)

Corresponde al porcentaje de microorganismos que son destruidos por la acción del desinfectante, y se obtiene a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Eficiencia \%} = \left(\frac{N_0 - N_f}{N_0} \right) \times 100$$

Dónde:

N_0 = número de microorganismos iniciales.

N_f = número de microorganismos sobrevivientes al tiempo t.

2.7. Tiempo de reducción decimal (TRD)

Indica el tiempo necesario para disminuir en un ciclo logarítmico la cantidad de microorganismos presentes en una muestra de ensayo.

El tiempo de reducción decimal queda determinado por la siguiente expresión:

$$TRD = \frac{2,3}{k}$$

Dónde:

k = velocidad específica de muerte.

2.8. Coeficiente de dilución (η)

Expresa la relación entre la actividad y concentración del desinfectante frente a un determinado microorganismo, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$C^{\eta}t = \text{constante}$$

Dónde:

C = concentración del desinfectante.

t = tiempo de acción para disminuir en un determinado porcentaje la contaminación inicial de microorganismo.

η = coeficiente de dilución.

Luego, el coeficiente de dilución se obtiene a partir de la siguiente expresión:

$$\eta = \left(\frac{\text{Log } t_2 - \text{Log } t_1}{\text{Log } C_1 - \text{Log } C_2} \right)$$

Dónde:

t = tiempo.

C = concentración.

(Arriagada, 2006)

2.9 Análisis estadístico.

Puesto que los ensayos se realizaron variando los factores en estudio, no fue posible realizar un análisis estadístico de la totalidad de los resultados obtenidos. Además, se debe considerar que las concentraciones recomendadas para los productos ensayados no eran iguales, hecho que no permite efectuar una comparación efectiva. Por lo tanto, el análisis de los datos y la comparación entre ellos se realizaron de forma cualitativa e individual.

VII. Resultados

1. Determinación de la CMI

1.1. CMI Producto A

No fue posible la determinación de la CMI para el desinfectante A, dado que al momento de poner en contacto el desinfectante con el caldo se producía turbidez, además de un precipitado blanco que impedía observar con claridad el crecimiento bacteriano. Esto pudo haber sido causado por la interacción de algún compuesto activo del producto desinfectante, como es el caso de los amonios cuaternarios que son afectados por la materia orgánica, en este caso el medio de cultivo utilizado (Romero J, 2014). Se intentó posteriormente determinar este parámetro a través de un método espectrofotométrico, pero tampoco se obtuvo resultados coherentes.

1.2. CMI Producto B

Tabla 1: Resultados CMI para desinfectante B sobre *Escherichia coli* y *Listeria innocua*.

[Desinf.]	0,025%	0,05%	0,1%	0,15%	0,2%	0,25%	0,3%	0,35%	0,4%	0,45%
<i>E.coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L.innocua</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Como se observa en la Tabla 1, en el caso de *Escherichia coli* hubo crecimiento bacteriano en los tres primeros tubos luego de transcurridas 24 h, siendo 0,15% la menor concentración donde no se registró crecimiento, por lo tanto resultó ser la CMI para el desinfectante B. Para *Listeria innocua* se observó crecimiento en los dos primeros tubos de concentraciones 0,025% y 0,05%, por lo que la CMI fue de 0,1%.

Tabla 2: Resumen CMI según desinfectante sobre *Escherichia coli* y *Listeria innocua*.

	[Desinfectante A]	[Desinfectante B]
<i>E. coli</i>	-	0,15%
<i>L. Innocua</i>	-	0,10%

Para el Producto B la CMI para *E.coli* fue de 0,15% siendo mayor a la concentración mínima requerida para inhibir el crecimiento de *L.innocua* que fue de 0,1%.

2. Determinación de la CMB

2.1. CMB desinfectante A

Tabla 3: Resultados CMB para desinfectante A sobre *Escherichia coli* y *Listeria innocua*.

[Desinf.]	0,05%	0,1%	0,15%	0,2%	0,3%	0,4%	0,5%	0,6%	0,7%	0,8%
<i>E. coli</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L.innocua</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

En el caso del producto A, dado que no se obtuvieron los datos de la CMI, se sembraron en placa todas las soluciones inoculadas con la bacteria en cuestión, y con la concentración correspondiente de desinfectante. Se observó crecimiento bacteriano en la primera placa para el caso de *Escherichia coli*, lo que corresponde a una concentración de 0,1%, en cambio para *Listeria innocua* no hubo crecimiento bacteriano en ninguna placa, por lo que la CMB es igual o menor a 0,05%.

2.2. CMB desinfectante B

Tabla 4: Resultados CMB para desinfectante B según bacteria en estudio.

[Desinf.]	0,025%	0,05%	0,1%	0,15%	0,2%	0,25%	0,3%	0,35%	0,4%	0,45%
<i>E. coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. innocua</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

De los resultados presentados anteriormente se observa que para *Escherichia coli* hubo crecimiento bacteriano en las tres primeras placas que corresponden a concentraciones de 0,025%, 0,05% y 0,1%. Además como se muestra en la Tabla 4 hubo proliferación de microorganismos en las dos primeras placas inoculadas con *Listeria innocua*.

Tabla 5: Resumen CMB según desinfectante sobre *Escherichia coli* y *Listeria innocua*.

	[Desinfectante A]	[Desinfectante B]
<i>E. coli</i>	0,10%	0,15%
<i>L. Innocua</i>	0,05%	0,10%

Se determinó la CMB para ambos desinfectantes obteniéndose que el desinfectante A para *Escherichia coli* se obtuvo una concentración de 0,1%, mientras que para *Listeria innocua* este valor fue de 0,05%. Para el producto B la CMB frente a *E. coli* fue de 0,15% y para *L. innocua* se obtuvo una concentración de 0,1%. Cabe destacar que para el producto B, la CMI fue igual a la CMB en ambas cepas. Al comparar la concentración bactericida, ésta fue mayor en *E. coli* en el caso de ambos desinfectantes, por lo que es posible inferir que esta bacteria presenta mayor resistencia que *L. innocua*. Al comparar entre desinfectantes se logra ver que ambas bacterias son más resistentes al desinfectante B, puesto que se requiere una concentración mínima bactericida más elevada.

3. Acción bactericida *in vivo* de los desinfectantes sobre las cepas en estudio

3.1. Acción de desinfectantes probada en acero inoxidable.

El acero inoxidable utilizado, es una superficie lisa, resistente a la corrosión, color metálico, espesor 1-2 mm y tiene una densidad de 7,96 g/cm³.

3.1.1. Acción de desinfectante A sobre *Escherichia coli*

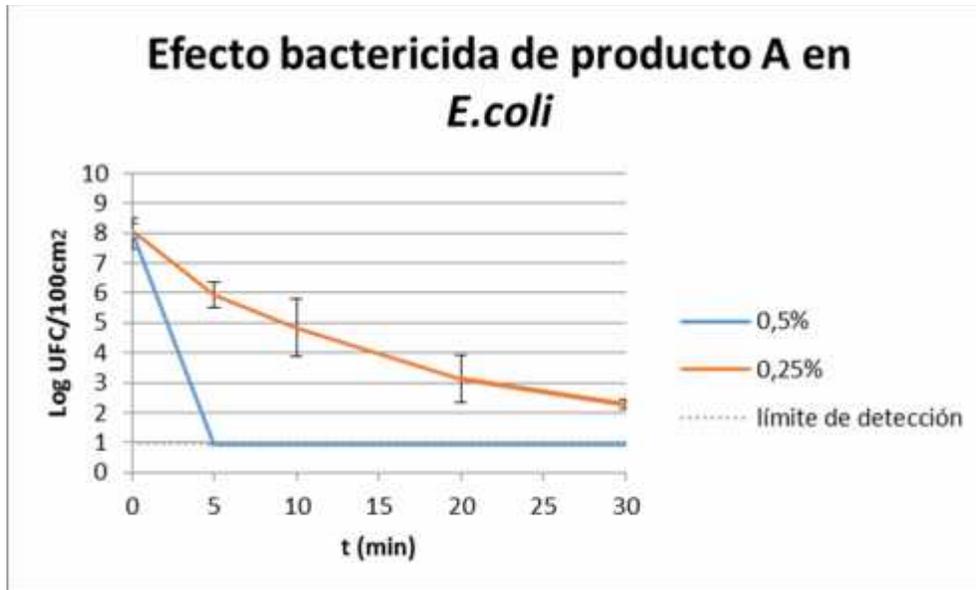


Figura 1: Acero inoxidable. Efecto *in vivo* de desinfectante A en concentraciones de 0,25% y 0,5% sobre *Escherichia coli*.

En la Figura 1, se observa la cinética de muerte de *Escherichia coli* en dos concentraciones de desinfectante que corresponden al mínimo y máximo indicados por el fabricante. Es posible notar una gran diferencia principalmente a los 5 min de exposición de la bacteria al desinfectante A. Al utilizar una concentración de 0,5% se logra una disminución de más de 6 ciclos logarítmicos mientras que a una concentración de 0,25% solo se disminuyen 2 ciclos logarítmicos en el mismo tiempo.

Tabla 6: Actividad bactericida del desinfectante A en *Escherichia coli* a diferentes concentraciones, prueba *in vivo* sobre Acero inoxidable.

Concentración	Tiempo (min)	N (UFC/100cm ²)	E (%)	k (min ⁻¹)	TRD (min)
0,25%*	0	1,3x10 ⁸	-	-	-
	5	1,1x10 ⁶	99,1476	0,95	2,41
	10	1,7x10 ⁵	99,8689	0,66	3,47
	20	2,9x10 ³	99,9978	0,54	4,29
	30	2,0x10 ²	99,9999	0,45	5,15
0,5%*	0	9,6x10 ⁷	-	-	-
	5	8,8x10 ⁰	99,9999	2,94	0,78
	10	8,8x10 ⁰	99,9999	1,55	1,48
	20	8,8x10 ⁰	99,9999	0,78	2,97
	30	8,8x10 ⁰	99,9999	0,52	4,45

*El fabricante recomienda el uso en un rango de concentraciones entre 0,25% y 0,5%.

Los datos presentados en la Tabla 6 muestran la E (%), k (min⁻¹) y TRD (min), a tiempos determinados y en distintas concentraciones. Se obtuvo eficiencia de 99,9999% a los 30 min para la concentración de 0,25% y a los 5 min para una concentración de 0,5%. La velocidad específica de muerte k disminuye a medida que aumenta el tiempo, dado que la concentración de desinfectante va disminuyendo con el tiempo; sin embargo, al comparar k a distintas concentraciones se obtiene una relación directamente proporcional ya que aumenta desde 0,95 (0,25%) a 2,94 (0,5%) a los 5 min y lo mismo ocurre a los otros tiempos.

El TRD disminuye al aumentar la concentración de desinfectante desde 2,41 (0,25%) a 0,74 (0,5%), lo que indica que a mayor concentración de desinfectante es menor el tiempo en conseguir la misma reducción.

3.1.2. Acción de desinfectante A sobre *Listeria innocua*.

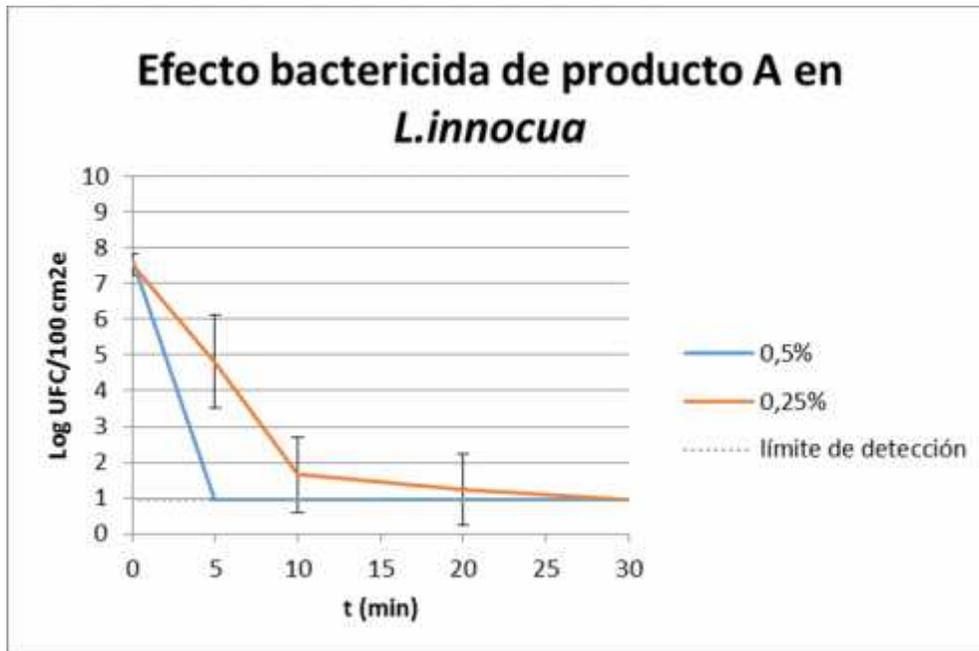


Figura 2: Acero inoxidable. Efecto *in vivo* de desinfectante A en concentraciones de 0,25% y 0,5% sobre *Listeria innocua*.

En la Figura 2 se observa la cinética de muerte de *Listeria innocua* a dos concentraciones distintas de desinfectante. Es posible notar que a los 5 min a una concentración de 0,25% se disminuyó la carga bacteriana en 2 ciclos logarítmicos mientras que a 0,5% la disminución fue de 6 ciclos logarítmicos, efecto similar al descrito en la Figura 1.

Si se compara esta figura con la de *E. coli*, es posible observar que el desinfectante A actúa con mayor rapidez sobre *Listeria innocua* que sobre *Escherichia coli* a la concentración de 0,25% y que tiene igual efecto en cuanto a rapidez a concentración 0,5%.

Tabla 7: Actividad bactericida del desinfectante A en *Listeria innocua* a diferentes concentraciones, prueba *in vivo* sobre Acero inoxidable.

Concentración	Tiempo (min)	N (UFC/100 cm ²)	E (%)	k (min ⁻¹)	TRD (min)
0,25%*	0	3,8x10 ⁷	-	-	-
	5	6,0x10 ⁴	99,8433	1,29	1,78
	10	4,6x10 ¹	99,9998	1,36	1,69
	20	8,8x10 ⁰	99,9999	0,73	3,15
	30	8,8x10 ⁰	99,9999	0,49	4,73
0,5%*	0	4,3x10 ⁷	-	-	-
	5	8,8x10 ⁰	99,9999	3,10	0,74
	10	8,8x10 ⁰	99,9999	1,47	1,56
	20	8,8x10 ⁰	99,9999	0,74	3,13
	30	8,8x10 ⁰	99,9999	0,49	4,69

*El fabricante recomienda el uso en un rango de concentraciones entre 0,25% y 0,5%.

En la Tabla 7, es posible observar que al utilizar el desinfectante A al 0,25% en *Listeria innocua*, se obtiene una eficacia de 99,9999% luego de 20 min, mientras que a una concentración de 0,5% este mismo valor se alcanza a los 5 min. Al comparar la eficiencia en *Listeria innocua* y *Escherichia coli* es posible notar que ésta es mayor en la primera, dado que se obtiene un valor de 99,9999% al 0,25% en 20 min, mientras que para *E. coli* se logra en 30 min. La eficiencia en ambas bacterias al usar una concentración de desinfectante del 0,5 % no demuestra una clara diferencia.

En cuanto a k y TRD se comportan de forma similar en *Listeria innocua* y *Escherichia coli*.

3.1.3. Acción bactericida de desinfectante B sobre *Escherichia coli*.

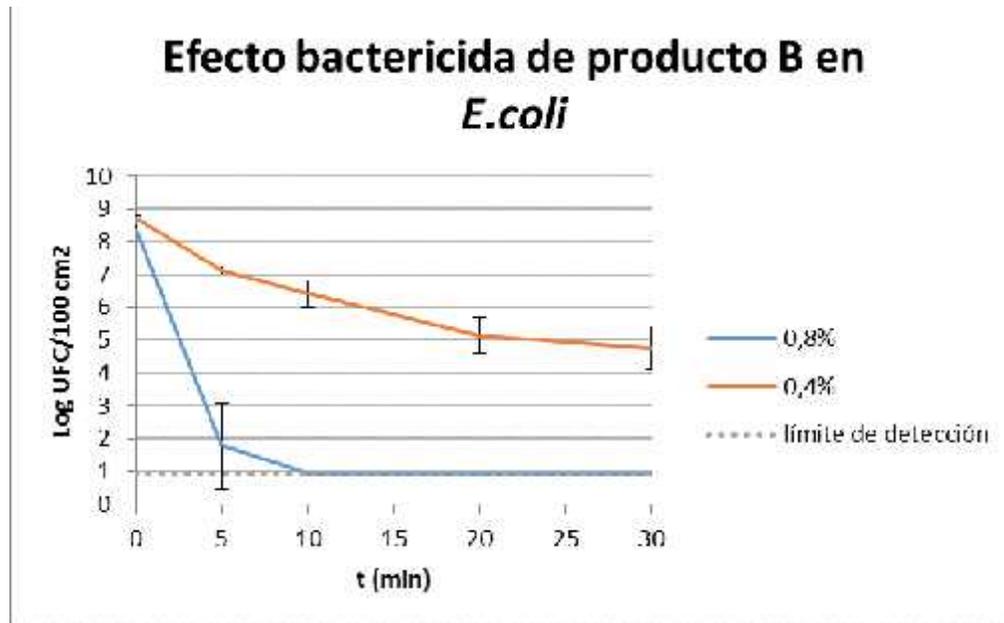


Figura 3: Acero inoxidable. Efecto *in vivo* de desinfectante B en concentraciones de 0,4% y 0,8% sobre *Escherichia coli*.

Como se puede ver en la Figura 3, el efecto bactericida del desinfectante B a una concentración de 0,4% logra una disminución de 3 ciclos logarítmicos en 30 min, mientras que al 0,8% es de más de 6 ciclos logarítmicos a los 10 min.

Si se compara la acción de ambos desinfectantes frente a *Escherichia coli* (Figura 1) es posible mencionar que a la mínima concentración indicada por el fabricante, el desinfectante A (0,25%) disminuye 2 ciclos logarítmicos en 30 min mientras que el desinfectante B (0,4%) logra reducir 3 ciclos logarítmicos en el mismo tiempo de acción. Además, al aplicar la máxima concentración 0,5% y 0,8% para los desinfectantes A y B respectivamente, se logra disminuir la carga bacteriana en más de 6 ciclos logarítmicos, en 5 min en el caso de desinfectante A y 10 min en caso del desinfectante B.

Tabla 8: Actividad bactericida del desinfectante B en *Escherichia coli* a diferentes concentraciones, prueba *in vivo* sobre Acero inoxidable.

Concentración	Tiempo (min)	N (UFC/100 cm ²)	E (%)	k (min ⁻¹)	TRD (min)
0,4%*	0	5,3x10 ⁸	-	-	-
	5	1,3x10 ⁷	97,5220	0,74	3,11
	10	3,3x10 ⁶	99,3710	0,51	4,54
	20	2,4x10 ⁵	99,9555	0,39	5,96
	30	1,1x10 ⁵	99,9789	0,28	8,15
0,8%*	0	2,2x10 ⁸	-	-	-
	5	6,0x10 ¹	99,9998	2,64	0,87
	10	8,8x10 ⁰	99,9999	1,63	1,41
	20	8,8x10 ⁰	99,9999	0,82	2,81
	30	8,8x10 ⁰	99,9999	0,54	4,22

*El fabricante recomienda el uso en un rango de concentraciones entre 0,4% y 0,8%.

En la Tabla 8 se observa que con el desinfectante B sobre *Escherichia coli* a una concentración de 0,4%, se obtiene una efectividad de 99,9% a los 30 min, mientras que en una concentración de 0,8% es posible llegar a 99,9999% en un tiempo de 5 min. En cuanto a la cinética de muerte a los 5 min, ésta es de 0,74 min⁻¹ (al 0,4%) y de 3,03 min⁻¹(al 0,8%), un valor bastante mayor. También se observan diferencias en los TRD al variar la concentración de desinfectante ya que a los 5 min, el tiempo de reducción decimal al 0,4% es de 3,11 min mientras que al 0,8% es de 0,76 min, por lo que en el último caso se observa una reducción mucho mayor que a la concentración más diluida.

3.1.4. Acción bactericida de desinfectante B sobre *Listeria innocua*.

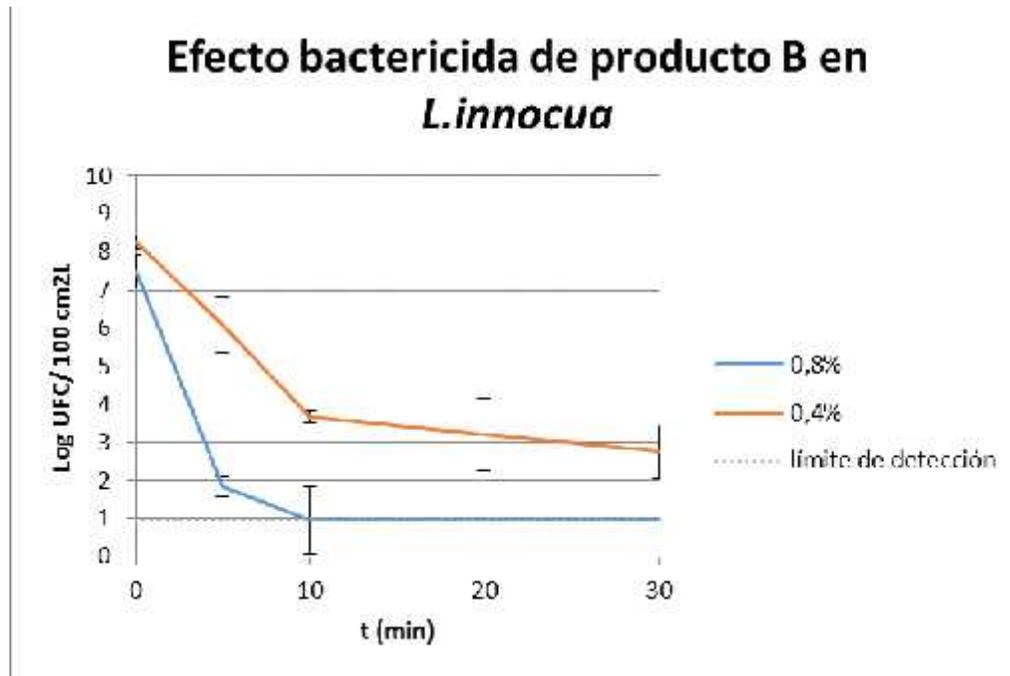


Figura 4: Acero inoxidable. Efecto *in vivo* de desinfectante B en concentraciones de 0,4% y 0,8% sobre *Listeria innocua*.

En la Figura 4 se observan las curvas de muerte de *Listeria innocua*, en las que es posible ver que a 0,4% a los 30 min de acción se logra una disminución de 5 ciclos logarítmicos, a diferencia de los más de 6 ciclos reducidos al usar una concentración de 0,8%, transcurridos 10 min de acción del producto.

Al comparar con la Figura 3, se observa que al 0,4% *Escherichia coli* es más resistente que *Listeria innocua*, ya que en el primer caso solo se logra reducir la población inicial en 3 ciclos mientras que para *Listeria innocua* la población disminuye en 5 ciclos en 30 min.

Tabla 9: Actividad bactericida del desinfectante B en *Listeria innocua* a diferentes concentraciones, prueba *in vivo* sobre Acero inoxidable.

Concentración	Tiempo (min)	N (UFC/100 cm ²)	E (%)	k (min ⁻¹)	TRD (min)
0,4%*	0	1,9x10 ⁸	-	-	-
	5	2,6x10 ⁶	98,6298	0,86	2,68
	10	4,9x10 ³	99,9974	1,06	2,18
	20	4,1x10 ³	99,9978	0,54	4,28
	30	1,3x10 ³	99,9993	0,40	5,78
0,8%*	0	4,1x10 ⁷	-	-	-
	5	7,5x10 ¹	99,9999	3,03	0,76
	10	8,8x10 ⁰	99,9999	1,47	1,57
	20	8,8x10 ⁰	99,9999	0,73	3,14
	30	8,8x10 ⁰	99,9999	0,49	4,71

*El fabricante recomienda el uso en un rango de concentraciones entre 0,4% y 0,8%.

De la Tabla 9 se puede deducir que la eficiencia obtenida al 0,4% del desinfectante B en *Listeria innocua* no supera el 99,999% en 30 min, mientras que al aumentar esta concentración a 0,8% en solo 10 min de contacto con el desinfectante, la población inicial se reduce en un 99,9999%. La cinética de muerte a los 5 min al 0,4% fue de 0,86 min⁻¹ bastante menos que al 0,8% que fue de 3,03 min⁻¹; aunque a los 30 min se obtienen valores más similares, 0,4 min⁻¹ (0,4%) y 0,49 min⁻¹ (0,8%).

El tiempo de reducción decimal es de 2,68 (0,4%) y de 0,76 (0,8%) a los 5 min, que es el tiempo en que se observan mayores diferencias.

3.2. Acción de desinfectantes probada en plancha de PEHD

El polietileno de alta densidad (PEHD natural) utilizado en este estudio, es el comercializado para uso como superficie de procesamiento de alimentos a nivel industrial. Es una plancha firme, color blanco, de 4 cm de espesor, presenta una densidad de $0,96 \text{ g/cm}^3$ y se observa como una superficie lisa, más compacta (menor cantidad de poros) que las usadas a nivel doméstico.

3.2.1. Acción de desinfectante A sobre *Escherichia coli*.

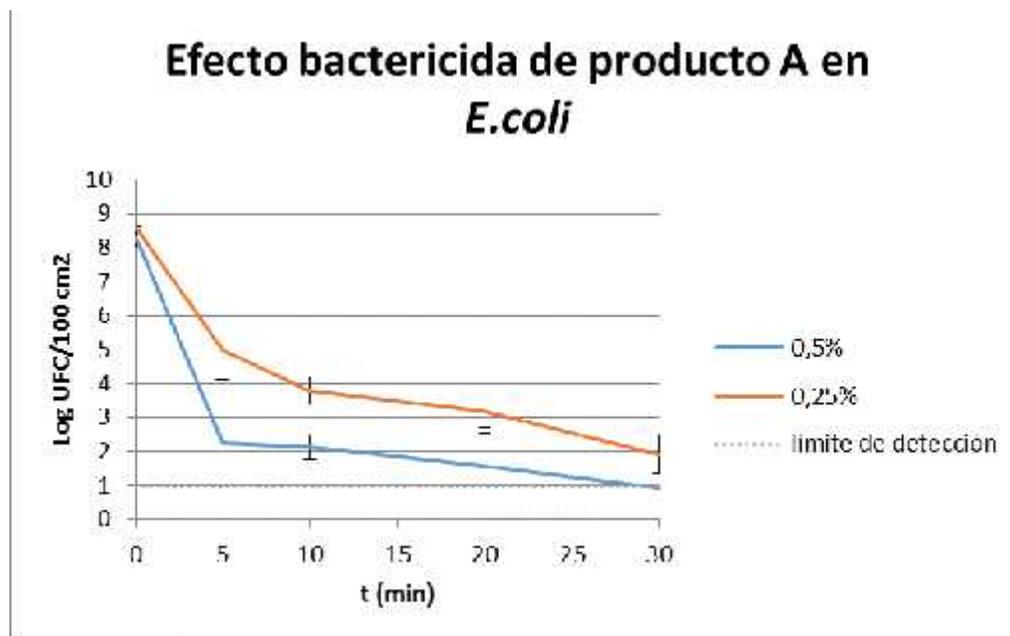


Figura 5: Efecto *in vivo* de desinfectante A en concentraciones de 0,25% y 0,5% sobre *Escherichia coli*.

Si bien la cinética de muerte para 0,25% y 0,5% es distinta, al cabo de transcurridos 30 min los resultados son similares ya que al 0,25% se disminuyen 6 ciclos y al 0,5% se logra bajar más de 6 ciclos. Si se compara con el mismo efecto del desinfectante A sobre una superficie de acero inoxidable (Figura 1), la disminución de la carga bacteriana a los 30 min, es bastante similar, sin embargo, en un rango de tiempo de 5 min se obtienen mejores resultados en cuando a acción biocida en superficies de acero inoxidable que en la plancha de PEHD.

Tabla 10: Actividad bactericida del desinfectante A en *Escherichia coli* a diferentes concentraciones, prueba *in vivo* sobre Plancha de PEHD.

Concentración	Tiempo (min)	N (UFC/100cm ²)	E (%)	k (min ⁻¹)	TRD (min)
0,25%	0	3,7x10 ⁸	-	-	-
	5	2,0x10 ⁵	99,9445	1,5	1,53
	10	7,4x10 ³	99,9980	1,08	2,13
	20	2,3x10 ³	99,9994	0,60	3,84
	30	1,3x10 ²	99,9999	0,50	4,64
0,5%	0	2,2x10 ⁸	-	-	-
	5	2,0x10 ²	99,9999	2,76	0,83
	10	1,7x10 ²	99,9999	1,41	1,63
	20	3,5x10 ¹	99,9999	0,78	2,94
	30	8,8x10 ⁰	99,9999	0,54	4,23

Aunque la acción del desinfectante A transcurridos 30 min es similar para ambas concentraciones en estudio, la mayor diferencia se aprecia a los 5 min, ya que al 0,25% se obtiene una eficiencia de 99,9% mientras que al 0,5% el valor aumenta a 99,9999%. Se observan diferencias también en la cinética de muerte k, ya que a los 5 min (al 0,25%) el valor es de 1,5 min⁻¹ probado en plancha de PEHD mientras que en acero inoxidable fue de 0,95 min⁻¹, aunque a los 30 min, no hay diferencias. En cuanto a los tiempos de reducción decimal no hay diferencia entre ambas superficies.

3.2.2. Acción de desinfectante A sobre *Listeria innocua*.

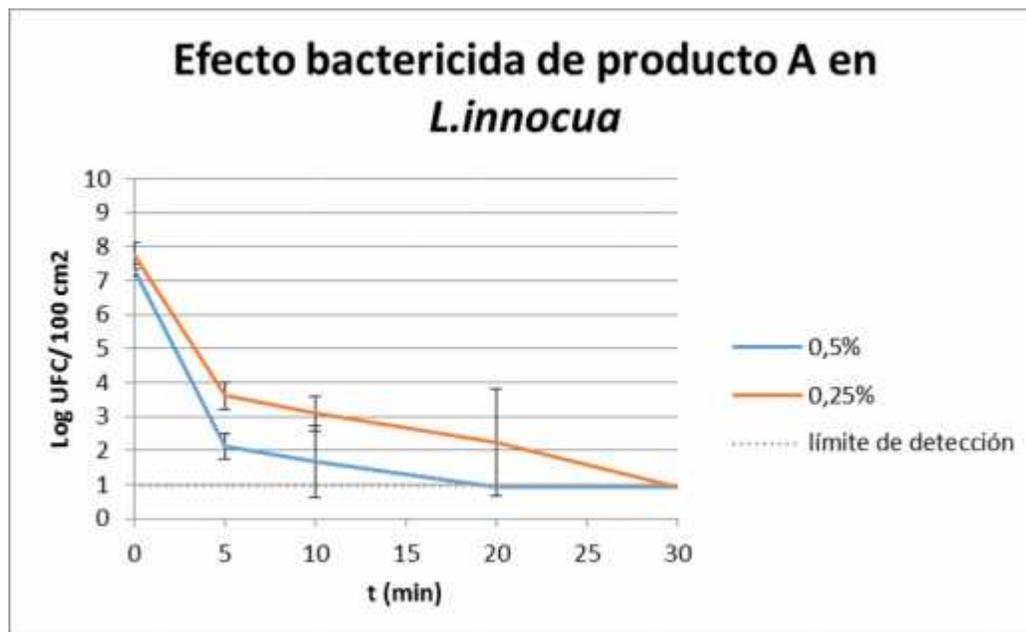


Figura 6: Plancha de PEHD. Efecto *in vivo* de desinfectante A en concentraciones de 0,25% y 0,5% sobre *Listeria innocua*.

En la gráfica (Figura 6) se puede apreciar que el producto A al 0,25% a los 5 min disminuyó en 4 ciclos logarítmicos la contaminación inicial, mientras que ésta bajó en 6 ciclos a la concentración de 0,5%. A diferencia de la prueba realizada sobre acero inoxidable (Figura 2), donde en el mismo tiempo la carga bacteriana bajó 2 ciclos al 0,25% y 6 ciclos al 0,5%, por lo que se logró una mayor efectividad del desinfectante A en acero inoxidable que en plancha de PEHD. No obstante, a los 30 min no se ven claramente estas diferencias, ya que las reducciones en ciclos logarítmicos se igualan.

Tabla 11: Actividad bactericida del desinfectante A en *Listeria innocua* a diferentes concentraciones, prueba *in vivo* sobre Plancha de PEHD.

Concentración	Tiempo (min)	N (UFC/100 cm ²)	E (%)	k (min ⁻¹)	TRD (min)
0,25%	0	7,2x10 ⁷	-	-	-
	5	5,5x10 ³	99,9924	1,90	1,21
	10	1,8x10 ³	99,9975	1,06	2,17
	20	1,8x10 ²	99,9998	0,65	3,56
	30	8,8x10 ⁰	99,9999	0,51	4,53
0,5%	0	2,0x10 ⁷	-	-	-
	5	1,3x10 ²	99,9999	2,78	0,83
	10	4,6x10 ¹	99,9998	1,30	1,77
	20	8,8x10 ⁰	99,9999	0,70	3,30
	30	8,8x10 ⁰	99,9999	0,46	4,95

Los datos presentados en la Tabla 11, muestran que la eficiencia del desinfectante A, sobre *Listeria innocua* a los 30 min no presenta diferencias entre las distintas concentraciones utilizadas, ya que en los dos casos se logra 99,9999% de eficiencia bactericida. Además, se puede comparar con la Tabla 7, donde se muestra que no hay diferencia entre la cinética de muerte, ni en los TRD entre ambas superficies analizadas, en cepas de *Listeria innocua*.

3.2.3. Acción de desinfectante B sobre *Escherichia coli*

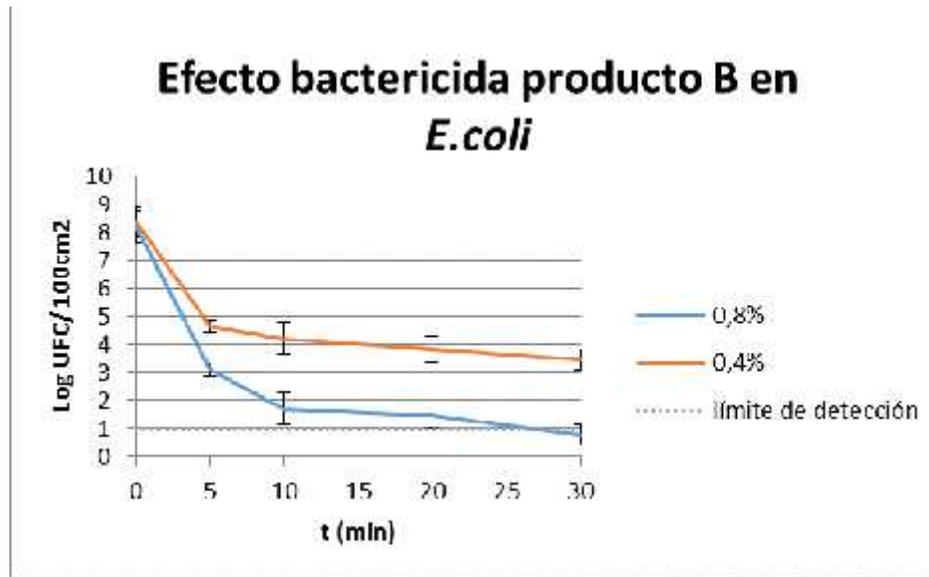


Figura 7: Plancha de PEHD. Efecto *in vivo* de desinfectante B en concentraciones de 0,4% y 0,8% sobre *Escherichia coli*.

En la Figura 7 se observa el efecto bactericida en *Escherichia coli*, al utilizar el producto B al 0,4%. Se obtiene una disminución de 5 ciclos logarítmicos al transcurrir 30 min, mientras que en una concentración de 0,8% es posible bajar la población inicial en más de 6 ciclos. En ambas curvas la mayor disminución se observa en los primeros 5 min, para posteriormente decrecer lentamente.

Al comparar con la Figura 3, dónde se muestra el efecto bactericida sobre acero inoxidable, se observa que al 0,4% se obtiene una disminución de 3 ciclos logarítmicos, mientras que en PEHD se disminuyen 5 ciclos logarítmicos en 30 min. Al 0,8% la mayor diferencia se observa luego de transcurridos 5 min, ya que en acero inoxidable se disminuye la carga bacteriana en más de 6 ciclos mientras que en PEHD se disminuyeron 4 ciclos logarítmicos.

Tabla 12: Actividad bactericida del desinfectante B en *Escherichia coli* a diferentes concentraciones, prueba *in vivo* sobre Plancha de PEHD.

Concentración	Tiempo (min)	N (UFC/100 cm ²)	E (%)	k (min ⁻¹)	TRD (min)
0,4%	0	4,0x10 ⁸	-	-	-
	5	4,8x10 ⁴	99,9446	1,50	1,53
	10	2,4x10 ⁴	99,9941	0,97	2,36
	20	9,1x10 ³	99,9978	0,54	4,30
	30	3,6x10 ³	99,9991	0,39	5,93
0,8%	0	1,8x10 ⁸	-	-	-
	5	1,8x10 ²	99,9984	2,21	1,04
	10	5,4x10 ¹	99,9999	1,50	1,53
	20	3,0x10 ¹	99,9999	0,78	2,95
	30	8,8x10 ⁰	99,9999	0,54	4,29

En la Tabla 12, se observa que la eficiencia se incrementa notoriamente al aumentar la concentración de desinfectante, siendo ésta a los 5 min de 99,9% al 0,4% y 99,9999% al 0,8%, además para la mínima concentración solo se obtiene una eficiencia de 99,999% a los 30 min de acción del producto. Al comparar la acción biocida con el desinfectante A (0,25% y 0,5%) sobre *Escherichia coli* en la misma superficie (Tabla 10), es posible notar que no hay diferencias sobre la eficiencia a los 5 min ni a los 30 min. Lo mismo ocurre si se observa la cinética de muerte y TRD.

3.2.4. Acción de desinfectante B sobre *Listeria innocua*.

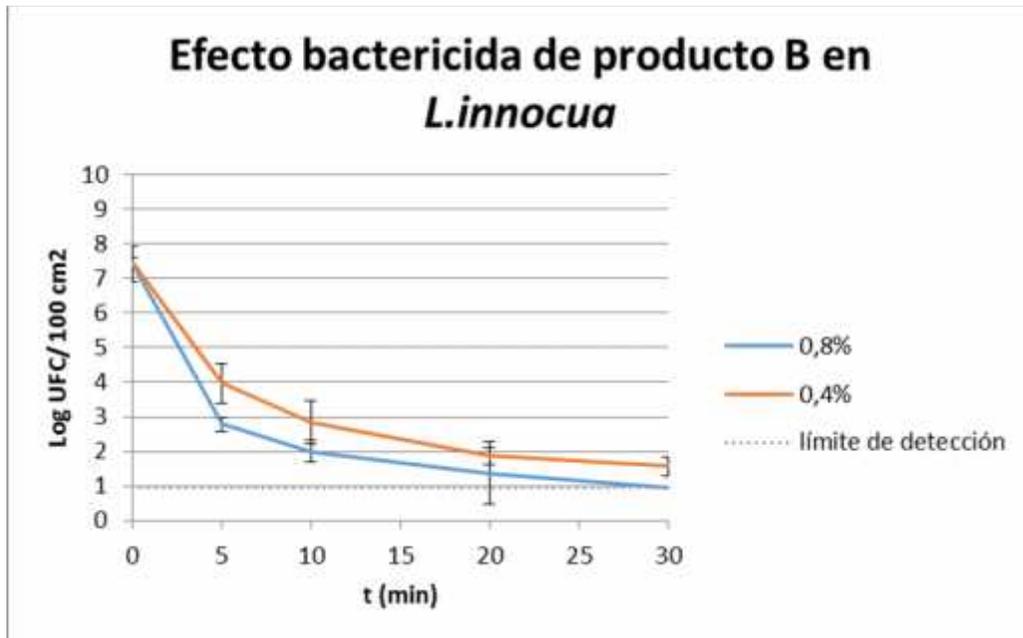


Figura 8: Plancha de PEHD. Efecto *in vivo* de desinfectante B en concentraciones de 0,4% y 0,8% sobre *Listeria innocua*.

En las curvas que se observan en la Figura 8, no se aprecian grandes diferencias al variar la concentración del desinfectante B. A los 5 min al 0,4% se disminuyó la población inicial en 3 ciclos logarítmicos, mientras que al 0,8% lo hizo en 5 ciclos logarítmicos. A medida que transcurrió el tiempo esta diferencia se hace más pequeña, sin embargo, al comparar el efecto bactericida en una superficie de acero inoxidable se observan diferencias de 4 ciclos logarítmicos entre ambas concentraciones de desinfectante B en un tiempo de 5 min y de 2 ciclos luego de transcurridos 30 min.

Al comparar con las curvas obtenidas para *Escherichia coli* (Figura 7) se aprecia que al aplicar una concentración de 0,4% de desinfectante, *Listeria innocua* se comporta de manera más sensible al producto, disminuyendo de forma considerable su población bacteriana.

Tabla 13: Actividad bactericida del desinfectante B en *Listeria innocua* a diferentes concentraciones, prueba *in vivo* sobre Plancha de PEHD.

Concentración	Tiempo (min)	N (UFC/100 cm ²)	E (%)	k (min ⁻¹)	TRD (min)
0,4%	0	3,0x10 ⁷	-	-	-
	5	1,6x10 ⁴	99,9881	1,81	1,27
	10	1,3x10 ³	99,9957	1,01	2,29
	20	8,2x10 ¹	99,9997	0,64	3,59
	30	4,1x10 ¹	99,9999	0,45	5,12
0,8%	0	4,0x10 ⁷	-	-	-
	5	6,4x10 ²	99,9993	2,39	0,96
	10	1,2x10 ²	99,9997	1,27	1,81
	20	2,4x10 ¹	99,9999	0,72	3,21
	30	8,8x10 ⁰	99,9999	0,49	4,72

En la Tabla 13 se observa que con ambas concentraciones y luego de transcurridos 30 min, se logra una eficiencia de 99,9999%, aunque al usar desinfectante al 0,8% esta eficiencia se logra a los 20 min. El valor de k a los 5 min es mayor en el caso de la concentración más alta, sin embargo, estos valores se igualan a los 30 min. Los TRD medidos al 0,8% son mayores que a una concentración de 0,4%, durante todo el tiempo de análisis.

Si se compara con la acción biocida en acero inoxidable (Tabla 9), a una concentración de 0,8% la mayor eficiencia se logra a los 10 min, mientras que en plancha de PEHD se obtiene el mismo resultado luego de 20 min.

4. Valores de coeficiente de dilución (η) de los desinfectantes.

4.1. Coeficientes de dilución en acero inoxidable

Tabla 14: Acero inoxidable. Valores de coeficiente de dilución (η) para los desinfectantes en estudio.

	<i>Listeria innocua</i>	<i>Escherichia coli</i>
Desinfectante A	1,00	1,58
Desinfectante B	2,58	2,58

Los coeficientes de dilución obtenidos para el desinfectante A se acercan o igualan a 1, lo que implica que la actividad del desinfectante varía en potencia de 1 con la concentración y con el tiempo de acción (Hugo, 1971). En el caso del desinfectante B, se obtuvo un η de 2,58 para ambas bacterias, por lo que queda demostrado que este desinfectante, que tiene coeficiente de dilución mayor pierde actividad rápidamente al diluirlo, dado que su acción es sensible a una variación en la concentración (Alba y Araujo, 2008).

4.2. Coeficientes de dilución en plancha de PEHD

Tabla 15: Plancha de PEHD. Valores de coeficiente de dilución (η) para los desinfectantes en estudio

	<i>Listeria Innocua</i>	<i>Escherichia coli</i>
Desinfectante A	2,00	2,58
Desinfectante B	1,00	2,58

El coeficiente de dilución obtenido para la plancha de PEHD en el caso de *Listeria innocua* y desinfectante B, al ser igual a 1 indica que no hay diferencias para mejorar el efecto bactericida entre variar el tiempo de contacto o la concentración de producto. En los demás casos los valores mayores son mayor a 1, por lo que al igual que sobre acero inoxidable la variación de la concentración de producto en las condiciones dadas, implica una mayor variación en la acción biocida, mientras que la variación del tiempo de acción será menos significativa.

VIII. Discusiones

Se debe considerar que en las indicaciones de uso del fabricante no se especifican tiempos recomendados, por lo que se determinó la cinética específica de muerte a los 5, 10, 20 y 30 min. Para facilitar el análisis comparativo entre todos los factores estudiados, se dio énfasis en los resultados obtenidos a los 5 min, ya que uno de los objetivos de una buena desinfección enfocada en industria de alimentos, en donde se tiene como prioridad las altas tasas de producción, es que el proceso de limpieza y desinfección de equipos y superficies de trabajo sea rápido (Medina y Valencia 2008).

Al comparar el efecto biocida entre ambas bacterias los resultados son claros y arrojan que ambos desinfectantes son más efectivos al aplicarlos sobre la bacteria Gram positiva, en este caso *Listeria innocua*, ya que en todos los casos se obtiene una mayor constante de velocidad específica de muerte k . Esto indica que esta bacteria disminuye su población inicial a una velocidad mayor que la bacteria Gram negativa. Esto se observó también en estudios similares realizados frente a estos dos tipos de bacteria y utilizando un desinfectante que contiene ácido peracético (López, 2002). La especificidad de la acción podría deberse principalmente a que la membrana externa de las bacterias Gram negativas actúa como una barrera que limita la entrada de varios tipos de agentes antibacterianos. De esta forma son más resistentes a desinfectantes, fenómeno que se observa constantemente al realizar este tipo de comparación entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, ya que estas últimas tienen una resistencia intrínseca (Cabrera *et al*, 2007). Además las moléculas del lipopolisacárido (LPS) que contienen las bacterias Gram negativas se oponen al rápido acceso de los biocidas hidrofóbicos al interior de la célula, probablemente mediante un sistema de protección brindado por los fosfolípidos. En caso de los bactericidas catiónicos como es el caso de los derivados de amonio cuaternario, interactúan con fosfolípidos y LPS, produciendo daño en la membrana celular (Camargo y Torres, 2003), las bacterias Gram positivas en cambio, tienen la pared compuesta de peptidoglicano y ácidos teicoicos, pero ninguno de estos parece ser una gran

barrera para la acción y entrada de los desinfectantes y antisépticos (Pérez, D. 2008).

Tabla 16: Resumen k, TRD y %E a los 5 min de acción de desinfectante.

Superficie	Desinfectante	Concentración	Bacteria	k (min ⁻¹)	TRD (min)	%E
Acero Inox	A	0,25%	<i>E.coli</i>	0,95	2,41	99,1476
			<i>L.innocua</i>	1,29	1,78	99,8434
Plancha de PEHD			<i>E.coli</i>	1,50	1,53	99,9445
			<i>L.innocua</i>	1,90	1,21	99,9924
Acero Inox		0,5%	<i>E.coli</i>	2,94	0,78	99,9999
			<i>L.innocua</i>	3,10	0,74	99,9999
Plancha de PEHD			<i>E.coli</i>	2,76	0,83	99,9999
			<i>L.innocua</i>	2,78	0,83	99,9999
Acero Inox	B	0,4%	<i>E.coli</i>	0,74	3,11	97,5220
			<i>L.innocua</i>	0,86	2,68	98,6298
Plancha de PEHD			<i>E.coli</i>	1,50	1,53	99,9446
			<i>L.innocua</i>	1,81	1,27	99,9881
Acero Inox		0,8%	<i>E.coli</i>	2,64	0,87	99,9998
			<i>L.innocua</i>	3,03	0,76	99,9999
Plancha de PEHD			<i>E.coli</i>	2,21	1,04	99,9984
			<i>L.innocua</i>	2,39	0,96	99,9993

Tal y como se muestra en la Tabla 16, al comparar entre bacterias se observa que en todos los casos se obtiene una mayor efectividad frente a *Listeria innocua* además de un menor tiempo de reducción decimal, mientras que la velocidad específica de muerte k es mayor, por lo que los resultados son concluyentes.

Se puede observar también que la utilización del desinfectante B en su mínima concentración recomendada 0,25% no logra una eficiencia ni siquiera del 99% sobre ninguna de las bacterias ensayadas en un tiempo de 5 min, además los tiempos de reducción decimal en ambos casos se encuentran en el orden de los

2,7 min para *Listeria innocua* y 3,1 min para *Escherichia coli*, lo que implica que para la reducción de 5 ó 6 ciclos se requiere un tiempo de 10 min o más, por lo que se debería considerar aumentar esta mínima concentración recomendada, ya que ésta no sería suficientemente efectiva en su función de desinfección de una superficie de trabajo de la industria alimentaria, poniendo en peligro la inocuidad del producto en elaboración.

Con respecto a los desinfectantes probados en el presente estudio, ambos son productos comercializados para su utilización en industria alimentaria, ya sea para limpieza de equipos (CIP), superficies u otras instalaciones, y ambos están constituidos por mezclas de compuestos. Además cada uno de los desinfectantes probados tienen un rango de aplicación diferente, por lo que las comparaciones se realizaron entre: mínimas y máximas dosis recomendadas, por ser estas diferentes.

Es importante destacar que ambos desinfectantes utilizados en las dosis recomendadas lograron una significativa disminución de la población bacteriana, por lo que serían adecuados para realizar procedimientos de desinfección exhaustiva, además las condiciones microbiológicas a las cuales estos fueron aplicados fueron bastante extremas ya que los recuentos iniciales de *Escherichia coli* estuvieron alrededor de 10^8 UFC/100 cm² y para *Listeria innocua* los recuentos fueron de 10^7 UFC/100cm², niveles que generalmente no son los habituales en la industria de alimentos.

Por lo general la industria de desinfectantes elabora mezclas de agentes químicos bactericidas de distintas clases para aumentar así el espectro de microorganismos que eliminará, por lo que se hace difícil la comparación entre productos, ya que su composición incluye varios agentes que en conjunto aumentan su efectividad frente a distintas clases de organismos.

Sin embargo y a pesar de estas condiciones, se observó una clara tendencia en lo que se refiere a una mayor efectividad en el caso del desinfectante A para ambos tipos de bacteria, como se muestra en la Tabla 17.

Los compuestos activos del desinfectante A son glutaraldehído y amonios cuaternarios, lo que lo convierte en un potente biocida capaz de disminuir en un rango corto de tiempo alrededor de 6 ciclos logarítmicos de microorganismos (Vizcaino y Herruzo, 2002), además su espectro de acción es bastante amplio, eliminando virus, bacterias, hongos y esporas (Prinal, 2014). Sin embargo, este compuesto ha mostrado tener efectos adversos como causar dermatitis al tener contacto directo con la piel, y puede causar rinitis y conjuntivitis al ser inhalado, por lo que es considerado como tóxico (Vizcaino y Herruzo, 2002). Es por esto que en el último tiempo se ha intentado reemplazar con otros agentes que sean menos corrosivos a base de ácido peracético y peróxido de hidrógeno por ejemplo, obteniendo resultados similares en cuanto a eficiencia germicida. Sin embargo según los datos recopilados en las condiciones expuestas anteriormente, sigue siendo el desinfectante A más efectivo contra los microorganismos en estudio, de tipo Gram negativo y Gram positivo, por lo que tendrían que cambiarse las condiciones del desinfectante B para mejorar su eficiencia, aumentándose la mínima concentración recomendada por el fabricante (Hernández *et al*, 2003).

Tabla 17: Resumen k, TRD y %E a los 5 min de acción de desinfectante

Bacteria	Concentración	Superficie	Desinfectante	k (min ⁻¹)	TRD (min)	%E
<i>E.coli</i>	0,25	A	A	0,95	2,41	99,1476
	0,4		B	0,74	3,11	97,5220
	0,5		A	2,94	0,78	99,9999
	0,8		B	2,64	0,87	99,9998
	0,25	P	A	1,50	1,53	99,9446
	0,4		B	1,50	1,53	99,9446
	0,5		A	2,76	0,83	99,9999
	0,8		B	2,21	1,04	99,9984
<i>L.innocua</i>	0,25	A	A	1,29	1,78	99,8434
	0,4		B	0,86	2,68	98,6298
	0,5		A	3,10	0,74	99,9999
	0,8		B	3,03	0,76	99,9999
	0,25	P	A	1,90	1,21	99,9924
	0,4		B	1,81	1,27	99,9881
	0,5		A	2,78	0,83	99,9999
	0,8		B	2,39	0,96	99,9993

Es posible observar en la Tabla 17, que en general se mantiene la tendencia que el desinfectante A presenta un mayor porcentaje de eficiencia que el desinfectante B, esta comparación se logra manteniendo constantes todos los demás parámetros.

El mayor efecto biocida que posee el producto A, se relaciona entre otros factores, con los compuestos tensioactivos que contiene, estos actúan disminuyendo la tensión superficial que se produce cuando el producto se pone en contacto con la superficie en estudio, por lo que se impide que la solución forme gotas que resbalen sin adherirse (Sanz, 2016).

También se puede deducir de la tabla anterior que los tiempos de reducción decimal son siempre mayores en el caso del desinfectante B, y por ende la

velocidad específica de muerte es menor para este producto. Aunque se debe tener presente que al usar la máxima concentración recomendada por el fabricante para cada desinfectante, los resultados de eficiencia llegan a igualarse obteniéndose la misma acción bactericida.

Como ya se mencionó, las concentraciones recomendadas para cada uno de los desinfectantes son distintas, lo que demuestra que el poder biocida de compuestos como glutaraldehido y amonios cuaternarios requiere de una baja dosis para obtener buenos resultados de desinfección.

Para el desinfectante A, el rango de concentraciones recomendada por el fabricante es de 0,25% a 0,5% aplicado por aspersion que fue lo que se realizó en este estudio.

Tabla 18: Comparación bactericida entre ambas concentraciones recomendadas para desinfectante A, a los 5 min de acción.

Superficie	Bacteria	Concentración	k (min ⁻¹)	TRD (min)	%E
Acero Inox	<i>E.coli</i>	0,25	0,95	2,41	99,1476
		0,5	2,94	0,78	99,9999
	<i>L.innocua</i>	0,25	1,29	1,78	99,8434
		0,5	3,10	0,74	99,9999
Plancha de PEHD	<i>L.innocua</i>	0,25	1,90	1,21	99,9924
		0,5	2,78	0,83	99,9999
	<i>E.coli</i>	0,25	1,50	1,53	99,9446
		0,5	2,76	0,83	99,9999

En la Tabla 18 es posible observar las diferencias existentes entre la aplicación del producto a concentraciones de 0,25% y de 0,5%. El efecto germicida que se logra al aplicar el producto A al 0,25% durante 5 min, no es suficiente para la disminución de la carga bacteriana en más de 4 ciclos logarítmicos, mientras que si esta concentración se aumenta al doble, es posible bajar la población inicial en hasta 6 ciclos logarítmicos lográndose eficiencias de 99,9999%, al igual que en

estudios similares realizados con desinfectantes en base a glutaraldehido (Vizcaino y Herruzo, 2002).

Al observar los tiempos de reducción decimal, las diferencias se hacen evidentes y al igual de lo que ocurre con la cinética de muerte k , al variar la concentración de desinfectante A, disminuyen considerablemente los tiempos llegando a la mitad o la tercera parte para bajar un ciclo logarítmico. Resultados similares se obtienen en estudios *in vitro*, encontrándose diferencias claras en la capacidad bactericida de los desinfectantes en el rango de las concentraciones recomendadas (Gallardo M, 2006).

Tabla 19: Comparación bactericida entre ambas concentraciones recomendadas para desinfectante B, a los 5 min de acción.

Superficie	Bacteria	Concentración	k (min ⁻¹)	TRD (min)	%E
Acero Inox	<i>E.coli</i>	0,4	0,74	3,11	97,5220
		0,8	2,64	0,87	99,9998
	<i>L.innocua</i>	0,4	0,86	2,68	98,6298
		0,8	3,03	0,76	99,9999
Plancha de PEHD	<i>L.innocua</i>	0,4	1,81	1,27	99,9881
		0,8	2,39	0,96	99,9993
	<i>E.coli</i>	0,4	1,50	1,53	99,9446
		0,8	2,21	1,04	99,9984

Según los datos que se presentan en la Tabla 19, al aplicar el desinfectante B en una concentración de 0,4% solo es posible disminuir la carga bacteriana entre 1 y 3 ciclos logarítmicos en 5 min de acción, por lo que esta acción bactericida sería insuficiente en un proceso de desinfección exhaustivo y eficaz en superficies utilizadas para el procesamiento de alimentos.

La aplicación del desinfectante B en una concentración de 0,8% logra la disminución de entre 4 y 6 ciclos logarítmicos de carga bacteriana, bastante superior a la mínima concentración recomendada, por lo que al utilizar esta concentración se asegura una desinfección más eficiente.

En estudios realizados *in vitro* se logró determinar que el ácido peracético es eficaz contra cepas como *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* a concentraciones superiores a 0,1% (Briñez y Roig-Sagués, 2006) por lo que queda demostrado que es importante probar estos productos directamente en superficies de trabajo para obtener resultados más certeros en condiciones reales de contaminación.

Respecto a las superficies estudiadas, acero inoxidable y plancha de PEHD, ambas son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria, son planas, sin ranuras, grietas ni agujeros, sin embargo la plancha de PEHD se vio notoriamente más rugosa.

Tabla 20: Resumen k, TRD y %E a los 5 min de acción de desinfectante.

Desinfectante	concentración	Bacteria	Superficie	k (min ⁻¹)	TRD (min)	%E
A	0,25	<i>E.coli</i>	Acero Inox	0,95	2,41	99,1476
			Plancha de PEHD	1,50	1,53	99,9445
		<i>L.innocua</i>	Acero Inox	1,29	1,78	99,8434
			Plancha de PEHD	1,90	1,21	99,9924
	0,5	<i>E.coli</i>	Acero Inox	2,94	0,78	99,9999
			Plancha de PEHD	2,76	0,83	99,9999
		<i>L.innocua</i>	Acero Inox	3,10	0,74	99,9999
			Plancha de PEHD	2,78	0,83	99,9999
B	0,4	<i>E.coli</i>	Acero Inox	0,74	3,11	97,5220
			Plancha de PEHD	1,50	1,53	99,9446
		<i>L.innocua</i>	Acero Inox	0,86	2,68	98,6298
			Plancha de PEHD	1,81	1,27	99,9881
	0,8	<i>E.coli</i>	Acero Inox	2,64	0,87	99,9998
			Plancha de PEHD	2,21	1,04	99,9984
		<i>L.innocua</i>	Acero Inox	3,03	0,87	99,9999
			Plancha de PEHD	2,39	0,96	99,9993

Al observar los resultados de la Tabla 20, es posible notar que no se aprecia una misma tendencia al realizar una comparación entre superficies, ya que en algunos casos se obtiene mayor porcentaje de eficiencia al trabajar sobre acero inoxidable mientras que otras veces se obtienen mejores resultados en plancha de PEHD. Estas variaciones podrían haberse ocasionado por alguna variación de los parámetros que se consideraron constantes como la temperatura, por ejemplo, ya que está demostrado que pequeños cambios en este factor, tiene efectos considerables en la sobrevivencia de bacterias (Sudhaus *et al*, 2014). Durante el procedimiento experimental no se controló la temperatura ambiente, pudiendo afectar en los resultados obtenidos.

El acero inoxidable es el material más utilizado en industria alimentaria, ya que es resistente a los golpes, a la corrosión, dura mucho tiempo y es de sencilla fabricación, además de ser estable, inerte y de fácil limpieza (Boyd y cols, 2001). Aunque a simple vista no se observa, a escala microscópica el acero presenta diminutas oquedades (Frank y Chmielewski, 2001), lo cual permite una mayor retención de bacterias por el incremento del número de puntos de adhesión. Si bien, en la literatura existen investigaciones que afirman que a mayor rugosidad de la superficie es más difícil actuar frente a la contaminación microbiana que en superficies más bien lisas (Boulangue-Peterman y cols., 1997), los resultados no indicaron estas diferencias, lo que pudo haberse producido por la metodología de aplicación del producto desinfectante, puesto que este procedimiento se realizó por aspersión, y en la superficie lisa del acero inoxidable se observó que el líquido no se mantenía en contacto, resbalando hacia los costados, lo que no ocurría al aplicar el producto sobre plancha de PEHD, dado que esta superficie más rugosa contenía de forma homogénea el líquido desinfectante aplicado.

IX. Conclusiones

La concentración mínima inhibitoria para el desinfectante B, en el caso de *Escherichia coli* fue de 0,15% mientras que para inhibir el crecimiento de *Listeria innocua* este valor fue de 0,1%. No fue posible determinar la CMI para el desinfectante A.

La concentración mínima bactericida, para el producto A frente a *Escherichia coli* fue de 0,1% y frente a *Listeria innocua* fue de 0,05%. En el caso del desinfectante B la concentración mínima bactericida fue igual a la CMI y se obtuvo a concentraciones de 0,15% y 0,1% para *Escherichia coli* y *Listeria innocua* respectivamente.

El desinfectante A a una concentración de 0,5% logró disminuir en al menos 6 ciclos logarítmicos la población bacteriana presente en el área delimitada de ambas superficies en estudio, mientras que en una concentración del 0,25% esta disminución fue de 2 a 4, en 5 min de contacto.

El desinfectante B a una concentración de 0,4% fue capaz de bajar la población bacteriana inicial solo entre 1 y 3 ciclos logarítmicos, mientras que al ser utilizado en su máxima concentración indicada por el fabricante fue posible disminuir la carga bacteriana entre 4 y hasta 6 ciclos logarítmicos, al exponer las superficies contaminadas al producto durante 5 min.

El efecto bactericida del desinfectante A mostró ser superior al efecto bactericida del desinfectante B a las concentraciones recomendadas por el fabricante en un tiempo de 5 min, en acero inoxidable y PEHD.

De acuerdo a los parámetros determinados, el efecto germicida de los productos evaluados fue mayor frente a *Listeria innocua*, que frente a *Escherichia coli*.

No se encontraron diferencias entre el efecto germicida de los desinfectantes al aplicarlos sobre acero inoxidable o PEHD, por lo que no quedó demostrado que el acero inoxidable por ser un material menos poroso presente mejores resultados al aplicar procesos de sanitización.

El coeficiente de dilución de ambos desinfectantes fue mayor o igual a 1, lo que indica que variar la concentración de producto es más significativo que variar el tiempo de acción, en cuanto a efecto bactericida.

X. Bibliografía

ACHIPIA, 2013. "Introducción a la inocuidad alimentaria e institucionalidad" URL:

<http://www.minagri.gob.cl/wp-content/uploads/2013/11/Introducci%C3%B3n-a-la-Inocuidad-Alimentaria-e-Institucionalidad.pdf>

Alba N., Araujo F., (2008), "Evaluación de los desinfectantes utilizados en el proceso de limpieza y desinfección del área de fitoterapéuticos en laboratorios Prosanabell Ltda. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Arriagada, T. 2006. "Efecto biocida de un desinfectante de uso industrial sobre diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*". Memoria para optar al Título de Ingeniero en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Boulangue-Peterman L., Rault J y Bellon-Fontaine M. (1997). Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless Steel with different surface topography and roughness. Biofouling 11: 201-2016

Boyd R., Cole D., Rowe D., Verran D., Paul J., West R. (2001). Cleanability of soiled stainless steel a studies by atomic forcé microscopy and time of flight secondary ion mass spectrometry. Journal of Foof Protection 64: 87-93.

Briñez W., Roig-Sagués A., Hernández M., López-Pedemonte T., Guamis B. (2006). Bactericidal efficacy of peracetic acid combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus spp.*, *Listeria spp.* and *Escherichia coli*. 17(7): 516-521.

Cabrera, C.E., Gomez, F. Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Colombia médica 8(2):149-158.

Camargo A, Torres M., (2003). Evaluación de la efectividad de los desinfectantes Fagetril y Fagequat's en las superficies de los mesones de las plantas piloto de alimentos vegetales y lácteos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA). Microbiologías Industriales. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

Carpentier, B., Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences with particular references to hygiene in the food industry. J. Appl. Bacteriol., 75: 499-511

Chmielewsky, R.A.N., Frank, J.F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2: 22-32.

Figuroa, G., Faúndez, G., Troncoso, M., Navarrete, P. (2004); Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella Enterica* and *Campylobacter jejuni*, Laboratory of Microbiology, Institute of Nutrition and Food Technology, University of Chile. Macul 5540 Santiago, Chile. Método modificado.

Frank J., Chmielewski R. (2001). Influence of surface finish on the cleanability of stainless Steel. Journal of Food Protection 64: 1178-1182.

Fuster I Valls N, (2006), "Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas". Memoria de Título para acceder al grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona.

Gallardo M., 2006. Acción antimicrobiana de un desinfectante de uso industrial y doméstico sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Universidad de Chile.

Hernández A., Martró E., Puzo C., Burgués C., Vazquez N., Castella J., Ausina V., (2003). In-use evaluation of Perafase compared with Cidex in fiberoptic bronchoscope disinfection. J Hosp Infect. 54(1): 46-51.

Horna Quintana, G., Silva Díaz M., Taboada William, V., Ortiz Jesús, T. (2005). "Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas". Rev. Med. Hered. 16(1):39-45

Hugo, W.B., (1971) Chemical Disinfectants, Antiseptics and Preservatives. Department of Pharmacy. University of Nottingham England. Academic Press. London. New York.

ISO 17.604:2009. Microbiology of food and animal feed - Carcass sampling for microbiological analysis.

Limpieza y Desinfección (2015). Unidad didáctica 3. Pre-requisitos del APPCC. URL:

<http://ocw.upm.es/tecnologia-de-alimentos/seguridadalimentaria/contenidos/Lecciones-y-Test/Lec-3.1..pdf>

López, L., Romero, J. y Ureta, F. (2002). "Acción germicida *in vitro* de productos desinfectantes de uso en la industria de Alimentos". Archivos Latinoamericanos de Nutrición 52(1):74-76.

Martínez M., Domínguez J., (2013), Hospital Universitario de Ceuta, España. Guía de antisépticos y desinfectantes. URL:

http://www.ingesa.msc.es/estadEstudios/documPublica/internet/pdf/Guia_Antisepticos_desinfectantes.pdf

Medina L., Valencia L., (2008), "Evaluación de la eficacia de un desinfectante de alto nivel, a base de peróxido de hidrógeno empleado en la esterilización de dispositivos e instrumentos hospitalarios". Trabajo de grado para optar al título de microbiólogo industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

OMS, 2015 Portal de información: Medicamentos esenciales y productos de salud. Desinfectantes y antisépticos. URL: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5422s/19.html>

Pérez, D et al. (2008). “Revisión y actualización del programa de limpieza y desinfección de anglopharma s.a”. Trabajo de grado para optar al título de microbiólogo industrial, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

Prinal, 2013. Especificaciones técnicas Prinacid 3000

Prinal, 2014. Especificaciones técnicas KENOVIRO

Romero J M., (2014). Cátedra de Desinfectantes. Higiene y Sanidad Industrial. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Sanz A. (2016). “Química Orgánica Industrial”. URL: <http://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-10.php>

Sudhaus N., Nagengast H., Pina-Pérez M., Martinez A., Klein G., (2014). Effectiveness of peracetic acid-based disinfectant against spores of *Bacillus cereus* under different environmental conditions. Good Food 39: 1-7.

Vizcaino M., Herruzo R., Fernández M., (2002). Comparison of the disinfectant efficacy of Perasafe and 2% glutaraldehyde *in vitro* tests. Journal of Hospital Infection 53:124-128.

