



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

**EFECTIVIDAD *in vitro* DEL ÁCIDO  
PERACÉTICO FRENTE A CEPAS DE  
*Escherichia coli* Y *Listeria innocua***

**José Mario Romero Reyes**  
Patrocinante y Director  
Químico (UCh)

**Luis López Valladares**  
Director  
Químico Farmacéutico (UCh)

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

**Catalina Teresa Vargas Palacios**

Santiago, Chile

2018

*Este trabajo se lo dedico a mi familia, que siempre confi6 en mi y no dej6 que yo me rindiera.*

## Agradecimientos

Primero a mi familia, a mis padres que siempre me apoyaron y me animaron a seguir adelante, a mis hermanos, Alexis y Natalia, que siempre me han ayudado y que son parte de mi fortaleza, que siempre me escucharon cuando creía que no podría con la carrera, y me retaron por querer darme por vencida. Ustedes son mis pilares, mi fortaleza y mi alegría, los amo infinitamente.

A mis amigos, a los que encontré dentro de esta carrera, con los que sufrimos, peleamos y reímos durante estos años, después de todo este tiempo, logramos este objetivo de ser Ingenieros en Alimentos, y es lo mejor serlo junto a ustedes. Gracias Melissa por toda la ayuda y por ser una compañera inigualable, a Alicia, que fue la primera compañera con quien hable en el día uno de esta carrera, y que no dejamos de hablar hasta ahora que se convirtió en una compañera de aventuras asiáticas junto a Sebastián y Tamara. A Dharma por siempre acompañarme con una palabra o una risa, a Jessami por todas sus locuras y por sufrir siempre en los mismos ramos junto a Fernando. En fin, a todo el gran y hermoso grupo que formamos en la universidad. A mi amiga del alma, Loma, que es un apoyo en mi vida y que sabe sacar cualquier problema que tenga, y decirme las palabras que necesito escuchar.

Le agradezco a mi tata Pancho y a mi abuelita Cote, que se fueron antes de poder ver este momento, pero que han sido, y seguirán siendo, un ejemplo de vida para mí, de ellos aprendí que lo importante del éxito es conseguirlo con tu propio trabajo, que la palabra de uno tiene que valer más que un cheque en blanco y que los valores deben ser lo más importante en tu actuar, sin importar lo bueno o lo malo que puedas estar pasando.

En fin, a todas las personas que han pasado por mi vida, buenas o malas, que han hecho de mi la persona que soy ahora, gracias a todos, gracias a las vivencias que he tenido, con ustedes logré este objetivo en mi vida, muchas gracias.

## Índice

I. Resumen .....	5
II. Abstract .....	6
III. Introducción.....	7
IV. Hipótesis .....	11
V. Objetivos .....	11
5.1 Objetivo general.....	11
5.2 Objetivos específicos .....	11
VI. Materiales y Métodos .....	12
6.1 Materiales .....	12
Insumos:.....	12
Equipos: .....	12
Otros: .....	12
6.2 Metodología de trabajo .....	13
6.2.1 Recuento inicial de las cepas .....	13
6.2.2 Control del neutralizante .....	13
6.2.3 Determinación de la actividad antimicrobiana del desinfectante .....	13
6.2.4 Coeficiente de dilución ( $\eta$ ).....	15
6.2.5 Análisis estadístico.....	16
VII Resultados .....	17
7.1 Control de neutralizante.....	17
7.2 Acción desinfectante.....	17
7.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	18
7.2.2 <i>Listeria innocua</i> .....	20
7.3 Coeficiente de dilución ( $\eta$ ).....	22
VIII Discusiones.....	23
8.1 Acción desinfectante.....	23
8.2 Coeficiente de dilución ( $\eta$ ).....	27
IX Conclusiones .....	28
X Bibliografía .....	29
XI Anexos .....	32
Anexo 1: Análisis estadístico .....	32

Anexo 1.1: ANOVA multifactorial .....	32
Anexo 1.2: ANOVA simple .....	33

## I. Resumen

Para lograr la inocuidad de los alimentos, es necesario mantener la higiene dentro de todo el proceso productivo, ya sea en los operarios como en los equipos y materiales propios de la planta. Por esto, dentro de los planes de sanitización e higiene de cada industria, es importante la elección de los desinfectantes que se deben usar, ya que estos deben eliminar más del 99,999% de la población bacteriana presente en la superficie y no dejar residuos potencialmente tóxicos para el ser humano. Dentro de estos desinfectantes industriales se encuentra el ácido peracético, que es un perácido orgánico, corrosivo y con un alto poder oxidante, se comercializa como mezcla con agua oxigenada y ácido acético, estando el ácido peracético en una concentración del 95%. Este ácido se descompone rápidamente dejando como residuo agua, oxígeno y ácido acético, siendo inocuo para la salud humana.

El objetivo de este estudio fue determinar la acción biocida del ácido peracético por medio de la cinética de muerte de las bacterias *Listeria innocua* (Gram+) y *Escherichia coli* (Gram-), y calcular el coeficiente de dilución del desinfectante para cada cepa estudiada. La acción biocida se determinó por medio de ensayos *in vitro* a tres tiempos de acción, 0,5, 1 y 2 min, y tres concentraciones del desinfectante, 300, 500 y 1000 ppm; el fabricante solo indicaba como modo de uso 1000 ppm de concentración, y no un tiempo de acción; con estos parámetros se determinó la eficiencia germicida (%E), el tiempo de reducción decimal (TRD) y la velocidad específica de muerte (k).

Se determinó que este desinfectante es eficiente a una concentración de 300 ppm y un tiempo de acción de 2 min, con dicho tratamiento eliminó más del 99,999% de la población bacteriana de ambas cepas, se vio que el efecto biocida de este desinfectante es igual para ambos tipos de cepas, en donde se comparó los distintos parámetros, %E, TRD y k, por medio de un análisis ANOVA simple dando, en todos los casos, que no habían diferencias significativas entre *Listeria innocua* y *Escherichia coli*. Por último, el coeficiente de dilución resultó mayor que 1 para *Listeria innocua*, lo que indica que la eliminación de esta cepa por medio del APA depende más de la concentración que del tiempo de acción, e igual a 1 para *Escherichia coli*, lo que indica que su eliminación con APA depende tanto del tiempo de acción como de la concentración del desinfectante.

## II. Abstract

To achieve the food safety, it's necessary keep hygiene within the entire production process, either in the operators as in the equipment and materials of the plant. For this, in the sanitization and hygiene design of each industry, it's important the choice of disinfectants that should be used, since these should remove more than 99,999% of the bacterial population present on the surface and do not leave potentially toxic waste for humans. Inside these industrial disinfectants the peracetic acid is found. It is an organic peracid, corrosive and with a high oxidizing power, it is marketed as a mixture with hydrogen peroxide and acetic acid, being the peracetic acid in a concentration of 95%. This acid decomposes quickly in water, oxygen and acetic acid, being safety for the human health.

The aim of this study was determinate the biocidal action of peracetic acid by means of the death kinetics of the bacteria *Listeria innocua* (Gram+) and *Escherichia coli* (Gram-) and calculate the dilution coefficient of the disinfectant for each strain studied. The biocidal action was determined by tests *in vitro* to three action time, 0,5, 1 and 2 min and three disinfectant concentration, 300, 500 and 1000 ppm; the manufacturer only indicated 1000 ppm concentration as the mode of use, and not an action time; with theses parameters was determined the germicidal efficiency (%E), decimal reduction time (DRT), and the specific constant of death (k).

It was determined that this disinfectant is efficient to 300 ppm of concentration and 2 min of action time, with this treatment was removed more than 99,999% of the bacterial population of both strain, it was seen that the biocidal effect of this disinfectant was the same for both type of strain, where the different parameters, %E, DRT and k, were compared by means of a simple ANOVA analysis giving, in all cases, that there were no significant differences between *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. Finally, the dilution coefficient was greater than 1 for *Listeria innocua*, that means that the elimination this strain by means PAA depend more of concentration that of action time, and equal than 1 for *Escherichia coli*, that means that the elimination this strain by means PAA depends of both, the action time and the concentration of the disinfectant.

### III. Introducción

Dentro de la industria alimentaria, uno de los principales objetivos es que la producción de alimentos sea inocua para el consumidor, vale decir, que se cumpla lo establecido en el Codex Alimentarius: “*la garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso que se destinan*”. Para cumplir esto, uno de los objetivos generales del Codex de Higiene de los Alimentos es identificar los principios esenciales de higiene a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la producción primaria, hasta el consumidor final (CAC-7RCP 1-1969).

Una parte importante de la higiene en la industria alimentaria es la reducción o eliminación de la carga microbiana en la línea productiva de los alimentos, y para lo cual se pueden utilizar métodos físicos; 1) la esterilización por calor, que consiste en la exposición de una superficie a vapor o flameado (incineración). Este es un proceso de eliminación irreversible de la carga microbiana. 2) la congelación, que es un proceso de inhibición reversible del metabolismo microbiano; o 3) los métodos químicos, entre los cuales se encuentran los agentes desinfectantes, estos presentan acciones más flexibles, ya que puede ser inhibitoria o esterilizante dependiendo de la concentración del producto; estos agentes deben tener eficacia fiable e inocuidad absoluta para ser utilizado en la desinfección de una línea de producción alimentaria (Wildbrett, 2006).

Dentro de los agentes desinfectantes utilizados en el rubro, se encuentran los del tipo perácidos orgánicos, y el más común de éstos es el ácido peracético (APA). Este agente desinfectante se comercializa como mezcla con agua oxigenada y ácido acético. Los desinfectantes combinados con APA, tiene un fuerte poder corrosivo y comburente, también presenta buena acción biocida tanto en fase acuosa como en gaseosa. Estos tipos de desinfectantes tienen una buena acción en frío, por lo que se pueden utilizar a temperaturas hasta bajo los 10°C, aunque también muestra buenos resultados a temperaturas más altas (Wildbrett, 2006). Por otra parte, el APA es considerado como un desinfectante emergente que puede ser una alternativa al cloro. Tiene un potencial redox de 1.748 V, con electrodo estándar de hidrógeno (pH 0) y de 1.385 V bajo condiciones bioquímicas estándar (pH 7, 25°C y 101.325 Pa) (Zhang, 2018). El ácido se descompone rápidamente, dejando como residuo oxígeno, agua y ácido acético; esto hace que sea un producto inocuo (Kyanko, 2010), gracias a esta característica, el FDA (U.S. Food and Drugs Administration) considera este producto dentro del inventario de Sustancias eficaces para el Contacto con Alimentos (FSC, por su sigla en inglés). Según la publicación del FDA, Preventive Control Measures for Fresh and Fresh-cut produce, el APA ha demostrado ser más eficiente en el tratamiento de frutas en comparación con el cloro, inactivando biofilms de cultivos mixtos de *L. monocytogenes* y *Pseudomonas* sp en superficie de acero inoxidable.



Desinfectantes con APA reducen significativamente salmonelas y *E. coli* O157:H7 en superficie de melones (tipo cantalupo y tuna), en tratamientos de limpieza para almacenaje de naranjas, el tratamiento con APA redujo en un 85% el crecimiento bacteriano por contaminación con coliformes fecales, en comparación con el tratamiento con cloro que solo redujo un 60% dicho crecimiento y, por último, en tomates con un tratamiento estático de 2 min con solución de APA, redujo la población de *Salmonella Javiana* en un 96%, *L. monocytogenes* en un 99,96% y *E. coli* en un 99,5% (FDA, 2001).

Podemos concluir que el APA, utilizado en tratamiento de limpieza ya sea en forma directa en alimentos como en superficies en la línea productiva, es un desinfectante eficiente e inocuo para el ser humano. Por otra parte, en la investigación *in vitro* de Ureta (1997), el APA resultó tener mayor poder biocida, como desinfectante emergente, que el ácido láctico y el extracto de semilla de toronja.

*Escherichia coli* es una bacteria que se encuentra principalmente en el intestino de los animales de sangre caliente, por esto, se utiliza como indicador de contaminación por heces fecales en el control de inocuidad de los alimentos (FAO, 2011). A pesar de que la mayoría de las cepas son inofensivas para el ser humano, algunas pueden causar graves enfermedades gastrointestinales, como *E. coli* productora de toxina Shiga o cepa O157:H7, la que puede crecer a temperaturas entre 7 y 50°C, con una temperatura óptima de 37°C, prolifera en alimentos ácidos, con un pH hasta de 4,4 y en alimentos con un  $a_w$  de 0,95.

Algunos de los síntomas producidos por este patógeno son los calambres abdominales y la diarrea que podría llegar a ser colitis hemorrágica y desarrollar el síndrome urémico hemolítico (SUH), también puede haber fiebre y vómitos. El SUH se caracteriza por causar un daño renal agudo, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia. Si no se trata a tiempo, puede causar daño renal crónico y la muerte en niños menores de 5 años (OMS, 2016; Monteverde, 2014). En Chile, el SUH tiene una incidencia de 3,4 por cada 100000 niños menores de 5 años, si bien la mayoría de los niños se recupera de la enfermedad aguda, un 25% de ellos pueden evolucionar con problemas renales a largo plazo, como la proteinuria, HTA o insuficiencia renal crónica (Cubillos et al, 2015). La fuente de contaminación de *E. coli* son las heces fecales humanas y animales, y los principales alimentos que transmiten esta bacteria son los productos lácteos y jugos no pasteurizados, carne elaborada y cocida de manera insuficiente, frutas y hortalizas crudas. Por esto es imprescindible la higiene dentro de la producción de este tipo de alimentos, ya que se pueden contaminar por contacto directo en la recolección, crecimiento o manipulación de estos. (FAO, 2017)

Por otra parte, también se debe considerar la posible presencia de *Listeria*, la que se caracteriza por ser bacilo Gram+, es asporógeno, catalasa positiva y anaerobia facultativa. Es móvil entre 20 y 25°C, esto es provocado por flagelos de implantación periférica (3 o 4), esta movilidad desaparece a 37°C. Se describen 6 especies de

*Listeria*, que son *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* y *L. ivanovii*, esta última con las subespecies *ivanovii* y *londoniensis*. De estas especies, la única que es considerada patógena para el hombre es *L. monocytogenes*, las especies *innocua* y *grayi* son consideradas apatógenas, estas especies se diferencian entre sí según su capacidad de fermentar carbohidratos y capacidad  $\beta$ -hemolítica. *L. innocua* no fermenta el manitol ni la D-Xilosa, tiene una reacción variable con la L-Ramnosa y es negativo para la  $\beta$ -hemólisis (Sánchez, 2011). *L. monocytogenes* provoca la listeriosis, la cual es una enfermedad de transmisión alimentaria (ETA) atípica y emergente, por las manifestaciones sistémicas graves y por el número de brotes descritos desde la década de los 80, el reservorio de este patógeno es muy variado, pero la principal vía de contaminación es por los alimentos listos para el consumo que han sido guardados a temperatura de refrigeración por un tiempo muy prologado (González, et al, 2017). En clínica, esta enfermedad se puede presentar de dos formas, la gastroentérica y la invasiva, la gastroentérica puede no presentar síntomas o síntomas gastrointestinales de moderados a grave. En el cuadro invasivo, se pueden presentar síntomas como fiebre, calambres abdominales, diarrea, fatiga, dolor de cabeza y dolor muscular, meningoencefalitis y romboencefalitis, también se puede manifestar como infecciones focales que provoca artritis, osteoporosis, abscesos espinales o cerebrales, peritonitis, colesistitis y endocarditis. La población de riesgo son las embarazadas, ya que puede provocar aborto, nacimiento prematuro o mortinato en aproximadamente el 20% de los casos (entre 26 a 30 semanas de gestación), mayores de 50 años o personas inmunodeprimidas (González, et al, 2017; Alcayaga, 2008).

En los ensayos de laboratorio para exposición de *L. monocytogenes*, se debe utilizar un organismo sustituto, en este caso se utiliza *L. innocua*, ésta ha demostrado tener un crecimiento y resistencia igual a *L. monocytogenes* (Health Canada, 2012), pero es más seguro trabajar con esta especie ya que no es patógena para el ser humano. Según Friedly (2007), esta especie se comporta de manera parecida a la *L. monocytogenes* según los parámetros valor D y z. Esta comparación es posible debido a que estas dos especies son las que tienen una mayor cercanía taxonómica, ya que tienen una alta homología en la secuencia de rDNA 16. Por otra parte, uno de los serotipos de *L. monocytogenes* que más se ha aislado de alimentos es el 1/2 c, el cual es compartido con *L. innocua* (Ruíz, et al, 2008)

En la industria alimentaria, para la limpieza de las líneas productivas, se utilizan agentes químicos como los desinfectantes, por lo que es importante saber la capacidad germicida que estos tengan, para esto, se utilizan varios parámetros que dan cuenta de la eficacia frente a determinados microorganismos, y en estos parámetros es fundamental entender el efecto de la concentración del desinfectante y el tiempo de acción en la reducción de un microorganismo, el coeficiente de dilución relaciona estos dos parámetros (Araujo, 2008), de esta forma, podemos

determinar si la acción germicida de un desinfectante está determinada por el tiempo de acción, la concentración o ambos (Solar, 2008).

En este estudio, se determinó la acción biocida *in vitro* del ácido peracético (en mezcla como desinfectante industrial), por medio de la cinética de muerte de dos microorganismos, *E. coli* (Gram-) y *L. innocua* (Gram+), además de determinar el coeficiente de dilución del desinfectante con respecto a estas cepas. De esta forma obtener los parámetros necesarios para establecer la eficiencia del desinfectante a base de APA.

## IV. Hipótesis

La concentración recomendada por el fabricante, para el desinfectante a base de ácido peracético, reduce o elimina la contaminación presente.

## V. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Determinar la acción biocida *in vitro*, el coeficiente de dilución y otros parámetros del ácido peracético frente a *Escherichia coli* y *Listeria innocua*

### 5.2 Objetivos específicos

Determinar en cepas de *Escherichia coli* y *Listeria innocua* la cinética de muerte *in vitro* a diferentes concentraciones y tiempos de acción de ácido peracético.

Determinar la eficiencia germicida del ácido peracético, la velocidad específica de muerte y tiempo de reducción decimal para las cepas *Escherichia coli* y *Listeria innocua*.

Calcular el coeficiente de dilución para cada microorganismo en estudio

## VI. Materiales y Métodos

### 6.1 Materiales

#### Insumos:

- Cepas de *Listeria innocua* y *Escherichia coli*
- Ácido peracético 95%
- Medios de cultivo:
  - Agar tripticasa de soya (TSA)
  - Caldo de soya trípico (TSB)
- Neutralizante Universal:
  - Tween 80 12ml/100ml
  - Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1,6 ml/100ml
  - Diluyente c.s.p. 250ml:
    - Peptona 0,1%
    - NaCl 0,85g/100ml
    - H<sub>2</sub>O 500ml

#### Equipos:

- Autoclave
- Estufa de cultivo
- Vortex
- Otros equipos de trabajo en el Laboratorio de Microbiología Aplicada

#### Otros:

- Material de trabajo propio del Laboratorio de Microbiología Aplicada

## 6.2 Metodología de trabajo

### 6.2.1 Recuento inicial de las cepas

La cuantificación se realizó por el método de recuento en placa Petri. Para ello, se sembró 1 ml de cultivo de cada cepa, *Escherichia coli* y *Listeria innocua*, en agar trípticasa de soya (TSA), las placas se incubaron por 24 h a 37°C (Solar, 2008; Herrera, 2016)

### 6.2.2 Control del neutralizante

Este control tiene como objetivo determinar que el neutralizante es realmente efectivo y que no tiene un efecto bacteriostático o bactericida sobre los microorganismos de prueba.

Se prepararon 3 tubos de ensayo, uno con 9 ml de agua peptonada al 0,1% que se tomó como el control, otro con 9 ml de neutralizante para ver si éste tenía poder biocida y el tercero con 9 ml de neutralizante y 1 ml de biocida para ver si el neutralizante era efectivo frente al biocida. Luego se dejó reposar los 3 tubos de ensayo 10 min a temperatura ambiente, pasado este tiempo, los tres tubos son inoculados con 1 ml de cultivo del microorganismo correspondiente, cada cultivo con una concentración aproximada de  $10^9$  UFC/ml. Posteriormente se realizó un recuento en placa Petri sembrando en agar trípticasa de soya e incubando por 72 h a 37°C. Se efectuó el ensayo para ambos microorganismos por separado (Sutton, et al, 2002).

### 6.2.3 Determinación de la actividad antimicrobiana del desinfectante

Esta se determinó por medio de la cinética de muerte de *L. innocua* y *E. coli*, a 300, 500 y 1000 ppm de concentración del desinfectante y a 0,5, 1 y 2 min, tomando como referencia lo indicado por el fabricante (1000 ppm y sin tiempo de acción).

Se puso en contacto 1 ml del cultivo con 100 ml de solución desinfectante, quedando en una concentración inicial de  $10^7$  UFC/ml. Se tomaron muestras de 1 ml a tiempo 0 y a los tiempos ya mencionados, se depositó en tubos con neutralizante y luego de efectuar las diluciones decimales correspondientes, se realizó el recuento en placa Petri de los microorganismos sobrevivientes, para lo cual se sembró en TSA y se incubó por 24 h a 37°C.

### 6.2.3.1 Velocidad específica de muerte

La cinética de muerte de los microorganismos se expresó de acuerdo con la siguiente expresión:

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

Donde:

$N_0$ : número de microorganismos iniciales

$N_f$ : número de microorganismos sobrevivientes al tiempo t

t: tiempo de contacto entre el desinfectante y el microorganismo (min)

k: velocidad específica de muerte ( $\text{min}^{-1}$ )

La velocidad específica de muerte se calculó como la pendiente del ajuste lineal al graficar  $\log(N_f/N_0)$  v/s t (Herrera, 2016; Arriagada, 2006)

### 6.2.3.2 Eficiencia germicida (%E)

Se determinó como el porcentaje de destrucción del microorganismo durante el tiempo de acción del desinfectante, mediante la expresión (Solar, 2008):

$$\%E = \frac{N_0 - N_t}{N_0} \times 100$$

Donde:

$N_0$ : número de microorganismos iniciales

$N_f$ : número de microorganismos sobrevivientes al tiempo t

Se utilizó como criterio el Test de Chambers como límite de aceptación de eficiencia germicida, este señala que se acepta como buen producto desinfectante aquel que, a la concentración recomendada, elimine un 99,999% de una población bacteriana de entre  $7,5 \cdot 10^7$  y  $1,3 \cdot 10^8$  células/ml, en 30 seg (Ayres, 1980)

### 6.2.3.3 Tiempo de reducción decimal

Indica el tiempo necesario para disminuir en un ciclo logarítmico la cantidad de microorganismos presentes en una muestra de ensayo (Herrera, 2016)

El tiempo de reducción decimal (TRD) se determinó mediante la siguiente expresión:

$$TRD = \frac{2.3}{k}$$

Donde:

k: velocidad específica de muerte

### 6.2.4 Coeficiente de dilución ( $\eta$ )

Este coeficiente expresa la relación entre la concentración del desinfectante y la actividad de este frente a un determinado microorganismo, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$C^n t = constante$$

Donde:

C: concentración del desinfectante

t: tiempo de acción para disminuir en un determinado porcentaje la contaminación inicial del microorganismo

$\eta$ : coeficiente de dilución

El coeficiente de dilución se obtuvo mediante la siguiente expresión:

$$\eta = \frac{(\log t_2 - \log t_1)}{(\log c_1 - \log c_2)}$$

Donde:

t: tiempo

c: concentración



Este coeficiente muestra la dependencia de la acción del desinfectante con su concentración, en donde sí:

$\eta < 1 \rightarrow$  el efecto biocida depende más del tiempo de acción que de la concentración del desinfectante

$\eta > 1 \rightarrow$  el efecto biocida depende más de la concentración que del tiempo de acción del desinfectante

$\eta = 1 \rightarrow$  el efecto biocida depende de igual manera de la concentración y del tiempo de acción del desinfectante (Solar, 2008)

### 6.2.5 Análisis estadístico

Se calculó las diferencias significativas entre las concentraciones del desinfectante para cada cepa, esto por medio de un ANOVA multifactorial con un nivel de confianza del 95%.

También se calculó las diferencias significativas entre ambas cepas para un mismo tiempo de acción y concentración de desinfectante, y las diferencias significativas entre las pruebas de control del neutralizante, esto por medio de un análisis de ANOVA simple.

Para efectos de cálculo, se tomaron como factor el logaritmo en base 10 del recuento de colonias para todos los análisis.

Todos los análisis se hicieron con el programa Statgraphics Centurión XVI.II.

## VII Resultados

### 7.1 Control de neutralizante

**Tabla 1:** Control de neutralizante

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria innocua</i>
<i>Control</i>	1*10 <sup>9</sup> (a)	1,5*10 <sup>9</sup> (b)
<i>Neutralizante</i>	1,5*10 <sup>9</sup> (a)	1,2*10 <sup>9</sup> (b)
<i>Neutralizante + desinfectante</i>	0,7*10 <sup>9</sup> (a)	2,1*10 <sup>9</sup> (b)

Superíndices iguales indica que no hay diferencias significativas

La tabla 1 muestra los valores promedio del recuento en placa para cada cepa

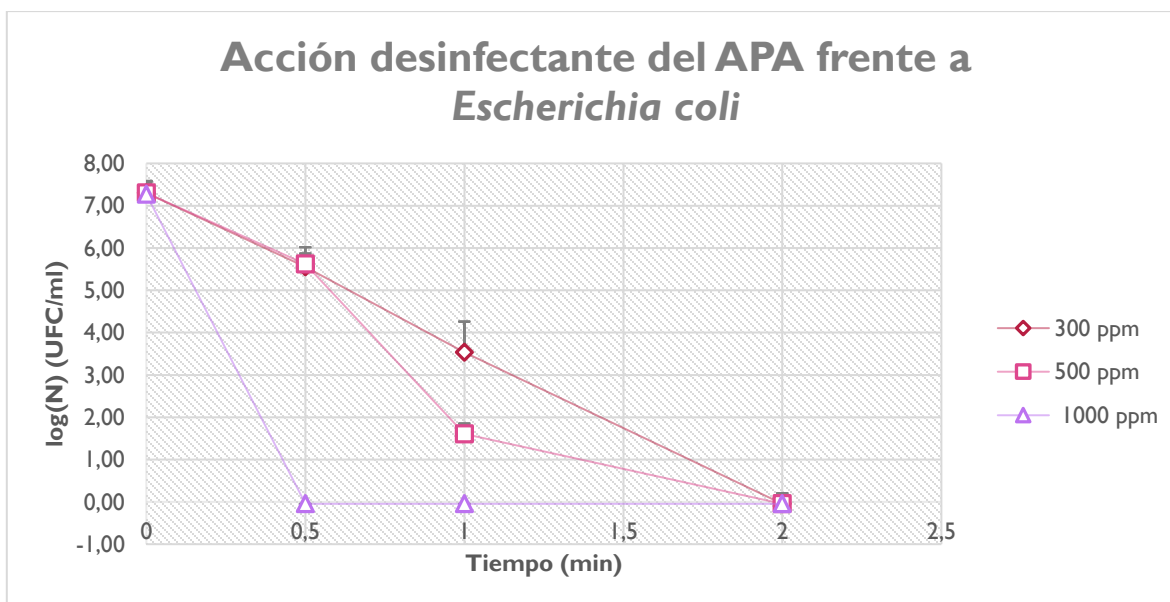
Como se observa en la tabla 1, el recuento de microorganismos iniciales (control) y sobrevivientes (neutralizante y neutralizante + desinfectante) son del orden de 10<sup>9</sup> en ambas cepas. Por medio de un análisis ANOVA simple se comprobó que no hay diferencias significativas entre el control, neutralizante y neutralizante + desinfectante, esto para ambas cepas, dando un valor-p de 0,5006 para *Escherichia coli* y de 0,4213 para *Listeria innocua*. Por lo tanto, el neutralizante no tiene acción biocida sobre estas cepas e inactiva la acción biocida del desinfectante.

### 7.2 Acción desinfectante

La acción desinfectante del ácido peracético se evaluó *in vitro*, cada concentración de desinfectante se evaluó en triplicado.

## 7.2.1 *Escherichia coli*

El recuento inicial de la cepa, para las tres concentraciones de desinfectante, fue del orden de  $10^7$  UFC/ml.



**Figura 1:** Acción desinfectante *in vitro* del ácido peracético a 300, 500 y 1000 ppm.

En la figura 1 se puede ver la cinética de muerte de *Escherichia coli* a tres concentraciones diferentes de desinfectante, se observa que, a 1000 ppm, concentración recomendada por el fabricante, se tiene una reducción de la población bacteriana hasta el límite de detección a los 30 seg. Con una concentración de 500 ppm, se observa una reducción drástica de la población bacteriana entre los 30 seg y el 1 min de acción, llegando al límite de detección a los 2 min de acción, también se observa que la cinética de muerte de *Escherichia coli* frente al APA es igual para las concentraciones 300 y 500 ppm entre los tiempos 0 y 30 seg. Por último, a los 2 min de tratamiento, las tres concentraciones llegan al límite de detección.

**Tabla 2:** actividad antimicrobiana del ácido peracético sobre *Escherichia coli*. Recuento de colonias (N), velocidad específica de muerte (k), tiempo de reducción decimal (TRD) y eficiencia germicida (%E).

Concentración (ppm)	Tiempo (min)	N (UFC/ml)	k (min <sup>-1</sup> )	TRD (min)	%E
300	0	2,0*10 <sup>7</sup>	-	-	-
	0,5	3,59*10 <sup>5</sup>	3,40	0,68	98,200%
	1	3,39*10 <sup>3</sup>	3,03	0,76	99,983%
	2	<10	2,29	1,00	>99,999%
500	0	2,00*10 <sup>7</sup>	-	-	-
	0,5	4,17*10 <sup>4</sup>	5,33	0,43	97,910%
	1	4,00*10 <sup>1</sup>	3,92	0,59	>99,999%
	2	<10	1,08	2,12	>99,999%
1000*	0	1,86*10 <sup>7</sup>	-	-	-
	0,5	<10	7,91	0,29	>99,999%
	1	<10	3,26	0,71	>99,999%
	2	<10	3,26	0,71	>99,999%

(\*) Concentración recomendada por el fabricante

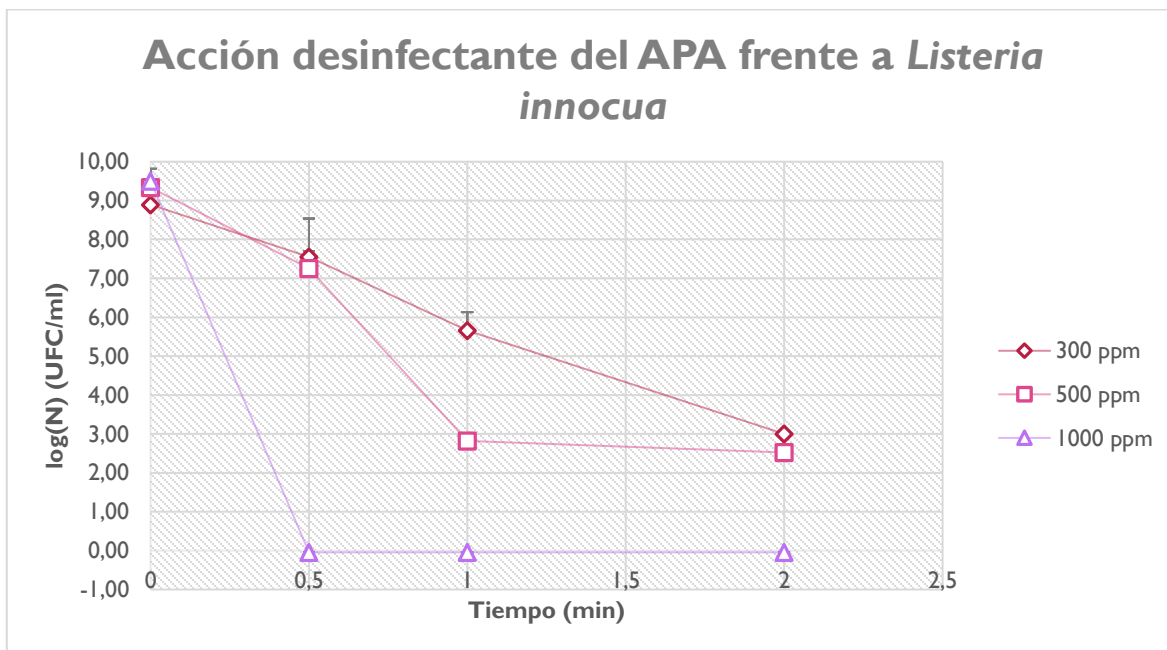
En la tabla 2 se presenta la velocidad específica de muerte, el tiempo de reducción decimal y la eficiencia germicida para *Escherichia coli* frente al ácido peracético a los tres tiempos y concentraciones estudiadas.

Se observa que, para la concentración de 300 ppm, se logra una reducción de 5 ciclos logarítmicos a los 2 min de acción. Por otra parte, se obtuvo una eficiencia germicida mayor a 99,999% al 1 min de acción con 500 ppm de desinfectante y desde los 30 seg con 1000 ppm de desinfectante, cumpliendo así con el Test de Chambers.

Por análisis de ANOVA multifactorial, se observó que no existen diferencias significativas en el recuento de microorganismos sobrevivientes entre diferentes concentraciones de APA con un valor-p de 0,1856 y 95,0% de confianza, tampoco hay diferencias significativas entre el recuento de microorganismos sobrevivientes a diferentes tiempos de acción, con un valor-p de 0,1290 a un 95,0% de confianza (Anexo 1.1).

## 7.2.2 *Listeria innocua*

El recuento inicial de la cepa fue del orden entre  $10^8$  y  $10^9$  UFC/ml.



**Figura 2:** Acción desinfectante *in vitro* del ácido peracético a 300, 500 y 1000 ppm.

La figura 2 muestra la cinética de muerte de *Listeria innocua* frente al ácido peracético estudiado en 3 concentraciones y 3 tiempos diferentes, siendo la concentración de 1000 ppm la recomendada por el fabricante.

Se observa que, a la concentración recomendada por el fabricante, se llega al límite de detección a los 30 seg de acción del APA. También se observa que, a la concentración de 500 ppm, hay una disminución drástica de la población bacteriana entre los 30 seg y 1 min de acción, entre 1 y 2 min de acción no se muestra una gran diferencia del recuento de sobrevivientes. Por último, se ve que la tasa de disminución de la carga bacteriana con respecto al tiempo, a una concentración de 300 ppm, es casi constante.

**Tabla 3:** actividad antimicrobiana del ácido peracético sobre *Listeria innocua*. Recuento de colonias (N), velocidad específica de muerte (k), tiempo de reducción decimal (TRD) y eficiencia germicida (%E).

Concentración (ppm)	Tiempo (min)	N (UFC/ml)	k (min <sup>-1</sup> )	TRD (min)	%E
300	0	7,84*10 <sup>8</sup>	-	-	
	0,5	1,11*10 <sup>8</sup>	3,16	0,73	94,431%
	1	1,17*10 <sup>6</sup>	3,00	0,77	99,942%
	2	1,00*10 <sup>3</sup>	2,68	0,86	>99,999%
500	0	2,16*10 <sup>9</sup>	-	-	
	0,5	1,82*10 <sup>7</sup>	6,08	0,38	99,158%
	1	6,67*10 <sup>2</sup>	3,69	0,62	>99,999%
	2	3,33*10 <sup>2</sup>	1,10	2,10	>99,999%
1000*	0	3,18*10 <sup>9</sup>	-	-	
	0,5	<10	10,33	0,22	>99,999%
	1	<10	4,25	0,54	>99,999%
	2	<10	4,25	0,54	>99,999%

(\*) Concentración recomendada por el fabricante

En la tabla 3 se presenta la velocidad específica de muerte, el tiempo de reducción decimal y la eficiencia germicida para *Listeria innocua* frente al ácido peracético a los tres tiempos y concentraciones estudiadas.

Se observó que, a una concentración de 300 ppm, se logra una reducción de 5 ciclos logarítmicos a los 2 min de acción, mientras que, a una concentración de 500 ppm, se logra esta misma reducción desde 1 min de acción. Por último, a la concentración recomendada por el fabricante, se obtiene una reducción mayor a 5 ciclos logarítmicos desde los 30 seg de acción, cumpliendo así con el Test de Chambers.

Se analizó si había diferencias significativas entre el tiempo de acción, la concentración y la reducción de la población bacteriana por medio de un ANOVA multifactorial, dando como resultados que no hay diferencias significativas entre los tiempos de acción con un valor-p de 0,1507 pero si hay diferencias significativas entre la concentración de APA con un valor-p de 0,0263. Este análisis se realizó a un nivel de confianza del 95,0% (Anexo 1.2).

### 7.3 Coeficiente de dilución ( $\eta$ )

**Tabla 4:** valores del coeficiente de dilución para ambas cepas.

	<i>Listeria innocua</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Coeficiente de dilución</i>	1,35	0,999

Como muestra la tabla 4, el  $\eta$  del APA para la *Listeria innocua* es mayor que 1, lo que implica que el efecto biocida de éste depende más de la concentración que del tiempo de acción, lo que también deja demostrado que el APA pierde actividad, frente a este tipo de bacterias, al ser diluido.

Por otra parte, el  $\eta$  del APA frente a la cepa de *Escherichia coli* es prácticamente igual a 1, esto quiere decir que el efecto biocida del APA frente a este tipo de bacterias depende del tiempo de acción y concentración del desinfectante en igual medida. Esto también se puede interpretar en que, al diluir el desinfectante, por ejemplo, a 1/3, este bajará su poder biocida en 1/3.

## VIII Discusiones

### 8.1 Acción desinfectante

Se comparó la acción desinfectante del APA frente a dos cepas, *Listeria innocua* y *Escherichia coli*, por medio del TRD, la %E y la k.

**Tabla 5:** Tiempo de reducción decimal y velocidad específica de muerte de las cepas frente al APA a diferentes concentraciones y tiempo de acción.

Concentración (ppm)	Tiempo de acción (min)	TRD (min)		k (min <sup>-1</sup> )	
		<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>
300	0,5	0,68 <sup>a</sup>	0,73 <sup>a</sup>	3,40 <sup>b</sup>	3,16 <sup>b</sup>
	1	0,76 <sup>a</sup>	0,77 <sup>a</sup>	3,03 <sup>b</sup>	3,00 <sup>b</sup>
	2	1,00 <sup>a</sup>	0,86 <sup>a</sup>	2,29 <sup>b</sup>	2,68 <sup>b</sup>
500	0,5	0,43 <sup>a</sup>	0,38 <sup>a</sup>	5,33 <sup>b</sup>	6,08 <sup>b</sup>
	1	0,59 <sup>a</sup>	0,62 <sup>a</sup>	3,92 <sup>b</sup>	3,69 <sup>b</sup>
	2	2,12 <sup>a</sup>	2,10 <sup>a</sup>	1,08 <sup>b</sup>	1,10 <sup>b</sup>
1000*	0,5	0,29 <sup>a</sup>	0,22 <sup>a</sup>	7,91 <sup>b</sup>	10,33 <sup>b</sup>
	1	0,71 <sup>a</sup>	0,54 <sup>a</sup>	3,26 <sup>b</sup>	4,25 <sup>b</sup>
	2	0,71 <sup>a</sup>	0,54 <sup>a</sup>	3,26 <sup>b</sup>	4,25 <sup>b</sup>

(\*) Concentración recomendada por el fabricante

Superíndices iguales indica que no hay diferencias significativas

Se comparó la k entre ambas cepas por medio de una ANOVA simple, la cual mostró que no había diferencias significativas entre ellas, con un valor-p de 0,4708 y un nivel de confianza del 95,0%. De esta forma se puede observar que la velocidad específica de muerte de ambas cepas frente al desinfectante es igual. También se comparó, por medio de un análisis ANOVA simple, las diferencias significativas entre el tiempo de reducción decimal de cada cepa, este análisis mostró que no hay diferencias significativas entre las cepas, con un valor-p de 0,4264 y un nivel de confianza del 95,0%. Se puede concluir que la cinética de muerte de ambas cepas es igual frente a este desinfectante a base de APA a las diferentes concentraciones y tiempos estudiados.

Las bacterias Gram+ poseen una gruesa capa de peptidoglucano, el cual se establece por enlaces cruzados y se encuentra anclado a la membrana citoplasmática por transpeptidasas y carboxipeptidasas. Estas proteínas, que son enzimas, se les denomina proteínas de unión a penicilina (PBP), estas enzimas son los sitios de acción de los antibióticos β-Lactámicos, lo que hace que las bacterias Gram+ sean más susceptible a la acción de antibióticos (Struthers, 2005; Tortora, et al, 2007). Por otra parte, el mecanismo de acción germicida del APA es la



inhibición de los grupos tioles en proteínas y enzimas (Cabrera, *et al.* 2007) y la acción oxidante, en donde se transfieren electrones entre la pared de los microorganismos y el APA, provocando así la inactivación e incluso la muerte de estos microorganismos (SEFH, 2014).

Las bacterias Gram- poseen una membrana externa la cual está compuesta principalmente por lipoproteínas y fosfolípidos. Estos compuestos le confieren una intensa carga negativa a la membrana externa, cumpliendo el objetivo de impedir la fagocitosis y la actividad del complemento, esta membrana externa se conecta con la capa de peptidoglucano (que es de mucho menor tamaño en este tipo de bacterias en comparación con las del tipo Gram+) por medio de unas estructuras proteicas llamadas porinas, estas proteínas funcionan como canales iónicos para el paso de pequeñas moléculas hidratadas (Struthers, 2005), y algunos biocidas tienen la polaridad suficiente para atravesar estas porinas para actuar sobre el peptidoglucano y seguir el mecanismo germicida antes descrito.

Como se mencionó anteriormente, el APA tiene la capacidad de inhibir los grupos tioles de las enzimas y es posible que debido a su poder oxidante polarice la membrana externa de las bacterias Gram- y/o tenga la polaridad suficiente para traspasar las porinas y llegar a la capa de peptidoglucano de este tipo de bacterias. Este podría ser el mecanismo de acción del APA frente a ambas cepas.

**Tabla 6:** Eficiencia germicida del APA, frente a ambas cepas, a diferentes tiempos y concentraciones de éste.

<i>Concentración (ppm)</i>	<i>Tiempo de acción (min)</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria innocua</i>
300	0,5	98,200% <sup>a</sup>	95,431% <sup>a</sup>
	1	99,983% <sup>a</sup>	99,942% <sup>a</sup>
	2	>99,999% <sup>a</sup>	>99,999% <sup>a</sup>
500	0,5	97,910% <sup>a</sup>	99,158% <sup>a</sup>
	1	>99,999% <sup>a</sup>	>99,999% <sup>a</sup>
	2	>99,999% <sup>a</sup>	>99,999% <sup>a</sup>
1000*	0,5	>99,999% <sup>a</sup>	>99,999% <sup>a</sup>
	1	>99,999% <sup>a</sup>	>99,999% <sup>a</sup>
	2	>99,999% <sup>a</sup>	>99,999% <sup>a</sup>

(\*) Concentración recomendada por el fabricante

Superíndices iguales indica que no hay diferencias significativas

No hay diferencias significativas en el porcentaje de eliminación de la carga bacteriana entre ambas cepas, esto se analizó por medio de un ANOVA simple, obteniéndose un valor-p de 0,4433 a un nivel de confianza del 95%.

Se observó que el desinfectante es efectivo con un tratamiento mínimo de 2 min y una concentración de 3 ppm o 1 min a una concentración de 500 ppm, en ambos casos se eliminó más del 99,999% de la carga bacteriana inicial de ambas cepas.

El APA se comercializa como una mezcla desinfectante (ácido peracético, ácido acético y agua oxigenada) para la industria cervecera, con el objetivo de eliminar materia orgánica en equipos de acero, tuberías, conexiones, bombas y mangueras (Prost, 2018), esto quiere decir que el APA está pensado para utilizarse como desinfectante de superficies o en sistemas CIP (clean in place). Por los resultados mostrados en la tabla 6, un tratamiento por 2 min con una concentración de 300 ppm del desinfectante sería suficiente para la desinfección.

Sin embargo, se debe tomar en cuenta los factores involucrados en una prueba *in vivo*, que no están representados en este estudio *in vitro*, como es el comportamiento de las bacterias en diferentes superficies. Según Herrera (2016), se obtiene una disminución de 5 ciclos logarítmico de *Escherichia coli* y *Listeria innocua* con un tratamiento de 5 min a una concentración de 0,8% (equivalente a 8000 ppm) de desinfectante solo en acero inoxidable, en dicho estudio, el desinfectante utilizado tiene una concentración de APA del 5%, en comparación al producto utilizado en este estudio que tiene una concentración del 95% de APA. Si bien ambos tratamientos de desinfección son diferentes, se puede observar que el APA es efectivo para desinfección en superficie de acero inoxidable, ya sea para bacterias Gram+ o Gram- y tomando en cuenta que los equipos utilizados en la industria alimentaria deben ser de acero inoxidable, se ve un buen efecto de este germicida para la industria. En plancha de polietileno de alta densidad logra una reducción de 4 ciclos logarítmicos para la *Escherichia coli* y de 5 ciclos logarítmicos para la *Listeria innocua*, se ve una leve disminución en la acción biocida con la bacteria Gram-, si bien en este estudio no se ven diferencias significativas en la disminución de la carga microbiana entre la *Listeria innocua* y la *Escherichia coli*, esta última, al ser una bacteria Gram-, tiene mayor resistencia a la acción biocida, como se mencionó anteriormente.

En el estudio hecho por Ureta (1997), se determinó el efecto germicida *in vitro* de un desinfectante emergente con una concentración de 2000 ppm de APA y a tiempos de acción de 0,5, 1 y 2 min frente a 4 cepas, 2 Gram+, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*, y 2 cepas Gram-, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se determinó, al igual que en el presente estudio, que el efecto biocida del APA no presenta diferencias entre los dos tipos de bacterias (Gram+ y Gram-).

En la ficha técnica del desinfectante P3-oxonia de Ecolab, desinfectante industrial a base de APA, se muestra el poder biocida de éste por el test de suspensión cuantitativo de la norma EN 1276 a 20°C, 5 min de contacto y en condiciones

limpias. Este resultado muestra que dicho desinfectante elimina 5 ciclos logarítmicos o más de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 (Gram-), *Escherichia coli* ATCC 10536 (Gram-) y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gram+) con una concentración de 0,1% (1000 ppm) y *Enterococcus hirae* ATCC 10541 (Gram+) a una concentración de 0,25% (2500 ppm), mostrando así que no hay diferencias en la eliminación de carga bacteriana entre bacterias Gram+ y Gram-.

En el estudio hecho por Graziano (2016), sobre la eficacia de la desinfección de un reprocesador automatizado de endoscopios flexibles, en donde el agente desinfectante era a base de APA al 0,2%, mostró ausencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 y *Bacillus subtilis* ATCC 19659 (Gram+) en una superficie de 37,5 cm<sup>2</sup>. En este caso también se observa que el APA elimina la carga bacteriana ya sean bacterias del tipo Gram+ o Gram-.

Según Flamenco y Guevara (2011), una formulación de desinfectante a base de APA al 0,26%, elimina más de 5 ciclos logarítmicos de las cepas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Se observa en estos resultados, que al igual que en el presente estudio, no hay diferencias en el poder biocida del APA entre una cepa Gram+ y otra Gram-.

Gracias a su efectividad e inocuidad para el ser humano, el APA ha sido considerado como seguro por el Food and Drugs Administration de los Estados Unidos (FDA) para ser utilizado en desinfección directa sobre canales de aves de corral y carne, y seguro para ser consumido por el ser humano (FDA, 2017). Por otra parte, el European Food Safety Authority (EFSA, 2014), en su opinión científica dijo que el APA es seguro para ser usado en métodos de desinfección para canales de ave de corral y carnes como la inmersión por corto tiempo a temperatura ambiente y a baja temperatura o por dispersión spray, dado su alta efectividad contra cepas como *Escherichia coli* y coliformes fecales, también el APA no representa riesgos al medio ambiente dado que se descompone en moléculas no tóxicas para el ser humano o el ambiente.

## 8.2 Coeficiente de dilución ( $\eta$ )

Como se mencionó en la tabla 4, el coeficiente de dilución fue mayor que 1 para *Listeria innocua*, por lo que el efecto biocida del APA para esta cepa depende más de la concentración que del tiempo de acción, e igual a 1 para *Escherichia coli*, por lo que el efecto biocida del APA sobre esta cepa depende de igual manera del tiempo de acción y de la concentración del desinfectante. En términos prácticos, esto implica que, si se necesitara una acción biocida más potente para eliminar *Listeria innocua* con este desinfectante, es más efectivo aumentar la concentración de éste que el tiempo de acción, ya que el primer factor influye más en el poder biocida de la solución desinfectante. En el caso de *Escherichia coli*, ambos factores, tiempo de acción y concentración del desinfectante, tienen la misma influencia en el poder biocida de la solución desinfectante. Cabe mencionar que es más recomendable aumentar el tiempo de acción antes que la concentración de desinfectante, ya que siempre puede ser potencialmente más peligroso manejar altas concentraciones de cualquier agente químico.

Se observó diferencias significativas en el recuento de sobrevivientes de *Listeria innocua* entre la concentración más baja (300 ppm) y la más alta (1000 ppm) de desinfectante, tal y como muestra el coeficiente de dilución calculado, en donde se observa la influencia de la concentración de desinfectante en la eliminación de carga bacteriana y no así el tiempo de acción. Por su parte, con un coeficiente de dilución igual a 1, como en el caso de *Escherichia coli*, no debería haber diferencias significativas en el recuento de sobrevivientes entre tiempo de acción y/o concentración de desinfectante, y así fue el resultado del ANOVA multifactorial, en donde no se encontraron diferencias significativas para el recuento de sobrevivientes de esta, lo que muestra que el tiempo de acción y la concentración de desinfectante influyen de igual forma en la eliminación de esta carga bacteriana.

Según Herrera (2016), el coeficiente de dilución fue mayor que 1 para ambas cepas en plancha de acero inoxidable, en cambio, en plancha de polietileno de alta densidad, este coeficiente fue igual a 1 para la *Escherichia coli* y mayor que 1 para la *Listeria innocua*, al igual que en este estudio. Se puede ver que el comportamiento de la *Escherichia coli* con el APA varía según el medio en donde se encuentre, esto puede estar relacionado al comportamiento de la pared externa de las bacterias Gram-.

Se debe considerar que el coeficiente de dilución es específico para cada cepa y desinfectante, según Gallardo (2006), la *Escherichia coli* tiene un coeficiente de dilución de 2,4, esto comparado con otro desinfectante de uso industrial y doméstico. Por lo que el coeficiente de dilución se puede interpretar como la dependencia del microorganismo con respecto a la concentración y tiempo de acción de cada desinfectante.

## IX Conclusiones

Se cumple lo establecido en la hipótesis, demostrando que el ácido peracético es efectivo a la concentración recomendada por el fabricante (1000 ppm), además, se estableció que con dicha concentración el desinfectante elimina más del 99,999% de la población bacteriana, tanto de *Escherichia coli* como de *Listeria innocua*, con un tiempo de acción de 30 seg, cumpliendo así con el test de Chambers.

Se pudo establecer que el desinfectante es efectivo, eliminando más del 99,999% de la población bacteriana de las cepas *Escherichia coli* y *Listeria innocua*, con una concentración mínima de 300 ppm y un tiempo de acción de 2 min.

El coeficiente de dilución de *Escherichia coli* resultó ser 0,999. Al ser casi igual a 1, implica que el efecto biocida del ácido peracético sobre esta cepa depende del tiempo de acción y de la concentración de desinfectante en igual medida. El coeficiente de dilución de *Listeria innocua* fue de 1,35. Por ser mayor a 1, implica que el efecto biocida del ácido peracético sobre esta cepa depende más de la concentración de éste que del tiempo de acción.

Se estableció que no existen diferencias significativas en el efecto biocida del ácido peracético para ambas cepas, por lo que este desinfectante podría ser efectivo para bacterias Gram+ y Gram- al mismo tiempo de acción y concentración. Esto hace que el desinfectante estudiado sea de mayor utilidad en la industria alimentaria, ya que puede eliminar o bajar la carga bacteriana de una alta variedad de bacterias que pueden estar presente en cualquier tipo de industria, y no solo en la industria cervecera, que es el fin con el cual se comercializa este desinfectante.

Por último, se recomienda hacer pruebas *in vivo*, simulando superficies o sistema CIP a escala, para comparar la efectividad del ácido peracético como desinfectante de superficies con los resultados expuestos en este estudio y ver así su utilidad en la industria alimentaria.

## X Bibliografía

Alba, N., Araujo, F. 2008. Evaluación de los desinfectantes utilizados en el proceso de limpieza y desinfección en el área de fitoterapéuticos en laboratorios Pronabell Ltda. Tesis (grado, Microbiólogo Industrial). Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. 20p

Alcayaga, S., Hott, B. 2008. *Listeria* y listeriosis: un desafío de los nuevos tiempos. Revista Chilena de Salud Pública. 12(3):188-195.

Arriagada, T. 2006. Efecto biocida de un desinfectante de uso industrial sobre diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 14p

Ayres, J.C., Mundt, J. O., Jandine, W. E. Microbiology of Foods. San Francisco. W. H. Freeman and Co. 1980.

Cabrera, C., Gómez, R., Zúñiga, A. 2007. La resistencia de las bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes, una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Colombia Médica. 38(2):149-158

CAC-7RCP 1.1969. CODEX, Principios generales de higiene de los alimentos.

Cubillos, M., Salas, P., Zambrano, P. 2015. Microalbuminuria en pacientes pediátricos con diagnóstico de síndrome hemolítico urémico. Revista Chilena de Pediatría. 86(2): 92-96.

EFSA BIOHAZ. 2014. Scientific opinion on the evaluation of the safety and efficacy of peroxyacetic solutions for reduction of pathogens on poultry carcasses and meat. EFSA Journal 12(3):3599

FAO, EMPRES. 2011. Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales, 39:20

FAO. 2011. Prevención de la *E. coli* en los alimentos [en línea] [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/pdf/Preventing\\_Ecoli\\_es.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf) [consulta: 3 junio 2017]

FDA. 2001. Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazard on fresh and fresh-cut produce – Method to Reduce/Eliminate Pathogens from fresh and fresh-cut produce [en línea], <http://thefogtunnel.com/wp-content/uploads/downloads/2011/12/USDA-Methods-to-Reduce-Eliminate-Pathogens-from-Fresh-and-Fresh-Cut-Produce.pdf> [consulta: 3 junio 2017]

FDA. 2017. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption, specific usage additives, peroxyacids. [en línea] <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=173.370> [consulta: 3 julio 2018]

Flamenco, J., Guevara, G. 2011. Formulación de tres productos desinfectantes y evaluación de su actividad antimicrobiana. Memoria para optar al grado de Licenciatura en Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador, Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia.

Friedly, E. 2007. *Listeria innocua* use as a surrogate for *Listeria monocytogenes*. Universidad de Arkansas.

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. Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias químicas y Farmacéuticas. 31p.

González, A., Cecchini, Diego, M. 2012. Organización Panamericana de la Salud. Diagnóstico e investigación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por los alimentos, Listeriosis [En línea] <http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroetas/modulo2/modulo2z.html>

Graziano, K., Pereira, ME., Koda, E. 2016. Methodological proposal for validation of the disinfecting efficacy of an automated flexible endoscope reprocessor. Latino-Am. Enfermagem. 24:2745.

Health Canada. 2012. *Listeria monocytogenes* Challenge Testing of Refrigerated Ready-to-Eat Foods. Food and Nutrition.

Herrera, J. 2016. Efecto bactericida de desinfectantes sobre cepas de *E. coli* y *L. innocua* en superficies de uso en la industria alimentaria. Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 14-17, 37-40p

Kyanko, M., Russo, M., Fernández, M. y Pose, G. 2010. Efectividad del Ácido Peracético sobre la reducción de la carga de Esporas de Mohos causantes de Pudrición Poscosecha de Frutas y Hortalizas. Información Tecnológica. 21(4): 125-130.

Monteverde, M. 2014. Síndrome Urémico Hemolítico. Nefrología, Dialisis y Transplante. 31(1): 27-41.

OMS 2016, Centro de prensa, *E. coli*, [en línea] < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>> [consulta: 20 mayo 2017]

- Prost. 2018. Desinfectante ácido peracético. [en línea] <http://www.prost.cl/producto/165.detergentesdesinfectantes/67.desinfectante-acido-peracetico-500-ml> [consulta: 3 julio 2018]
- Ruiz, Z., Poutou, R., Carrascal, A. 2008. Resistencia antimicrobiana y a desinfectantes de *Listeria* spp. Nova- publicación científica en ciencias biomédicas. 6(10):201-218.
- Sánchez, J., Serrano, S., Marfil, R., Jodral, M. 2011. Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino. Madrid, España. Días de Santos. 39-40p
- Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH). 2014. Desinfectantes de uso hospitalarios [en línea] < <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/antisepticos/4desinfectantes.pdf> > [consulta: 3 julio 2018]
- Solar, M. 2008. Monopersulfato de Potasio utilizado como biocida contra diferentes cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua* de colección. Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 8-12p
- Struthers, J., Westran, R. 2005. Bacteriología Clínica. Barcelona. Masson. 10-12p.
- Tortora, G., Funke, B., Case, C. 2007. Introducción a la Microbiología 9° edición. Editorial Médica Panamericana. 86p
- Ureta, F. 1997. Acción germicida *in vitro* de productos desinfectantes de uso en la industria de alimentos. Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- Wildbrett, G. 2006. Limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Zaragoza, España. Acribia. 53p y 96p.
- Zhang, C., Brown, P., Hu, Z. 2018. Thermodynamic properties of an emerging chemical disinfectant, peracetic acid. Science of the total environment. 621: 948 – 959.



## XI Anexos

### Anexo 1: Análisis estadístico

El análisis estadístico se basó en buscar diferencias significativas dentro de los distintos tratamientos con el desinfectante.

#### Anexo 1.1: ANOVA multifactorial

**Tabla a:** Valor-p de la ANOVA multifactorial del tiempo de acción y concentración del desinfectante para cada cepa a 95,0% de confianza

<i>Factores</i>	<i>Valor-p</i>	
	<i>Listeria innocua</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Tiempo de acción</i>	0,1507	0,1290
<i>Concentración</i>	<b>0,0263</b>	0,1856

**Tabla b:** Prueba de múltiples rangos de la concentración de desinfectante para cada cepa

<i>Concentración (ppm)</i>	<i>Media LS</i>	
	<i>Listeria innocua</i>	<i>Escherichia coli</i>
1000	-0,05 (a)	-0,05 (a)
500	4,2 (ab)	2,39 (a)
300	5,4 (b)	3,013 (b)

Superíndices iguales indican que no hay diferencias significativas

Prueba de múltiples rangos por el método de Tukey HSD con una confianza del 95%

## Anexo 1.2: ANOVA simple

**Tabla c:** Valor-p del análisis ANOVA entre ambas cepas para cada factor, logaritmo del recuento final ( $\log(N)$ ), velocidad específica de muerte ( $k$ ), tiempo de reducción decimal (TRD) y eficiencia germicida (%E) a un 95,0% de confianza

<i>Factores</i>	<i>Valor-p</i>
<i>log (N)</i>	0,2994
<i>k</i>	0,4708
<i>TRD</i>	0,4264
<i>%E</i>	0,4433