



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

Determinación del coeficiente de dilución de un desinfectante compuesto de amonio cuaternario frente a cepas de interés en productos alimenticios.

José Romero Reyes

Patrocinante y Director

Químico (UCH)

Luis López Valladares

Director

Químico Farmacéutico (UCH)

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

Melissa Andrea Givovich Díaz

Santiago, Chile

2018

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, quiero agradecer a mis padres por su constante apoyo y paciencia, además de permitirme estudiar sin endeudarme. Agradezco también a mi familia, en especial a mi Tata por todas las enseñanzas que me impartió hasta sus últimos días.

Les doy las gracias a los amigos que hice durante el transcurso de la carrera, quienes hicieron más ameno el paso por la Universidad. Les agradezco por todos los buenos momentos que compartimos y compartiremos en el futuro.

Agradezco a los profesores de la carrera que me ayudaron en mi formación como profesional, especialmente a mis profesores directores de memoria, Sr. Luis López Valladares y Sr. José Mario Romero, por su tiempo, paciencia y buena disposición en ayudarme y corregirme cuando lo necesitaba.

Muchas gracias a todas las personas que me apoyaron y ayudaron a forjarme como la persona que soy hoy en día.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	3
II. ABSTRACT.....	4
III. INTRODUCCIÓN	5
IV. HIPÓTESIS	9
V. OBJETIVOS.....	9
Objetivo General	9
Objetivos específicos	9
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	10
Materiales	10
Metodología de trabajo	11
VII. RESULTADOS	14
VIII. DISCUSIÓN	22
IX. CONCLUSIONES.....	29
X. REFERENCIAS	30
ANEXOS	35
I. Análisis de varianzas simple para la prueba del neutralizante.	35
II. Análisis de varianza multifactorial para los datos utilizados para determinar la acción germicida.	38

I. RESUMEN

El uso de un compuesto químico antimicrobiano apropiado es fundamental para prevenir el riesgo de contaminaciones por patógenos transmitidos por alimentos. En el mercado existe una amplia variedad de productos desinfectantes destinados al área de alimentos, por lo que es necesario evaluar y asegurar la eficiencia de éstos al emplearlos en las dosis y tiempos recomendados. En este estudio se utilizó un producto desinfectante de uso doméstico, recomendado principalmente para la desinfección de frutas y verduras, el cual tiene como principio activo el cloruro de benzalconio, que es un compuesto de amonio cuaternario, y se evaluó su acción germicida frente a cepas de *Listeria innocua* (Gram positiva) y *Escherichia coli* (Gram negativa), a distintas concentraciones (100, 160, 230 ppm) y tiempos de acción (3, 5, 10 min), todo esto con el fin de obtener el coeficiente de dilución (η) de este producto y determinar si este valor difiere para distintos tipos de bacterias. Además, se calculó la eficiencia germicida del desinfectante (E), la velocidad específica de muerte (k) y el tiempo de reducción decimal (TRD).

Los resultados mostraron una mayor eficiencia del desinfectante frente a la cepa de *L. innocua*, logrando una disminución de 5 ciclos logarítmicos a los 3 min de acción a la menor concentración analizada del desinfectante (100 ppm). Mientras que para *E. coli* a la concentración más alta del desinfectante (230 ppm) al mayor tiempo de acción (10 min) se alcanzó solo una reducción de 4 ciclos logarítmicos.

Los valores obtenidos para k y TRD evidenciaron una mayor efectividad del desinfectante frente al microorganismo Gram positivo, donde k fue siempre mayor para la cepa de *L. innocua*, lo que indica que disminuye a una velocidad mayor su población inicial.

En cuanto a η , para *E. coli* se obtuvo un valor de 1,1, mientras que para *L. innocua* fue mucho menor, de 0,04, por lo que se comprobó que este valor, para el mismo desinfectante, varía dependiendo del tipo de bacteria analizada.

II. ABSTRACT

The use of an appropriate antimicrobial chemical compound is fundamental to prevent the risk of contamination by food-transmitted pathogens. There are a wide variety of commercial disinfectants destined for the food area, according to this it is necessary to evaluate and ensure their efficiency when applied at times and concentrations recommended by the manufacturer. In this study, a domestic disinfectant was used, mainly recommended for the disinfection of fruits and vegetables, whose active ingredient is benzalkonium chloride, which is a quaternary ammonium compound. Its germicidal action was evaluated against strains of *Listeria innocua* (Gram-positive) and *Escherichia coli* (Gram-negative), at different concentrations (100, 160, 230 ppm) and reaction times (3, 5, 10 min), all of this to obtain the dilution coefficient (η) of this product and determine if this value differs for different types of bacteria. Additionally, the germicidal efficiency of the disinfectant (E), the inactivation rate constant (k) and the decimal reduction time (DRT) were calculated.

The results showed a greater efficiency of the disinfectant against the *L. innocua* strain, managing a decrease of 5 logarithmic cycles for 3 min reaction time at the lowest analysed concentration of the disinfectant (100 ppm). For *E. coli* a decrease of only 4 logarithmic cycles was achieved when using the highest concentration and the longest reaction time of the disinfectant, that is 230 ppm and 10 min, respectively.

The values obtained for k and DRT showed a greater effectiveness of the disinfectant against the Gram-positive microorganism, in which k was always greater for the *L. innocua* strain, which indicates that its initial population decreases at a higher speed.

As to η , for *E. coli* a value of 1,1 was obtained, whilst for *L. innocua* it was much lower, only 0,04. According to the obtained values, it can be concluded that for the same disinfectant, η varies depending of the type of bacteria analysed.

III. INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiológica de los alimentos se puede producir en cualquier etapa de la cadena de producción y, a pesar de los esfuerzos para reducirla al mínimo, no se ha logrado solucionar la aparición de brotes masivos de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), teniendo que dirigir campañas de vigilancia y asistencia continua, con el fin de prevenir o corregir situaciones de riesgo que afectan la salud de la población, así como también evitar que se ocasionen daños a la reputación de la marca, lo cual generalmente deriva en pérdidas financieras significativas (Kopper et al., 2009; Ulloa, 2016; Lim et al., 2017).

En nuestro país, para el primer trimestre del año 2018, se confirmaron 341 brotes de ETA, lo cual significa una disminución del 19% con respecto al mismo periodo del año 2017. En el Boletín Epidemiológico Trimestral, entregado por el Departamento de Epidemiología del Gobierno de Chile, se identificó que el lugar de elaboración al que se le asocian los mayores brotes de ETA corresponde al lugar de auto preparación, como por ejemplo el hogar, con un 45% de los casos, seguido por las instalaciones de elaboración y consumo, como restaurantes, con un 25% (MINSAL, 2018). Estos datos indicarían que la mayoría de estos brotes pudieron deberse a un uso inadecuado de las prácticas de limpieza y desinfección, así como a la posible formación natural de biofilms en ingredientes de los alimentos, en los manipuladores y/o en las superficies en contacto con alimentos, ya sea en la industria o a nivel doméstico (Lim et al., 2017).

Un biofilm es una comunidad bacteriana que se adhiere a superficies bióticas o abióticas, produciendo sustancias exopoliméricas que las protege del estrés ambiental, como el tratamiento con antibióticos o desinfectantes (Lim et al., 2017). Se estima que, por lo menos, el 65% de las infecciones bacterianas que se registran estarían asociado con la formación de un biofilm bacteriano (Nazar, 2007).

La presencia de biofilm en el área de alimentos es de gran importancia debido a que puede actuar como reservorio de microorganismos alterantes que modifiquen las características organolépticas del alimento, alterando su calidad final, o de

microorganismos patógenos, los cuales, como pueden llegar a presentar una mayor resistencia a la limpieza y desinfección, pueden transformarse en una fuente de contaminación microbiana, poniendo en riesgo la salud de los consumidores. Por lo tanto, se hace necesario la eliminación total de estos microorganismos, evitando que formen biofilm y/o contaminen el producto alimenticio (Lim et al., 2017; Milan et al., 2015).

Algunos microorganismos patógenos que pueden estar presentes en alimentos y que se han visto implicados en brotes de ETA son *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* (Beuchat, 1996). *Escherichia coli* es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Se puede encontrar en el sistema digestivo de animales, por lo que es usado como indicador de contaminación fecal en productos alimenticios, ya sean de origen animal o vegetal, incluyendo el agua potable (Ordoñez et al, 2017).

Listeria monocytogenes es un bacilo pequeño Gram positivo (Rojas, 2007) causante de la listeriosis, la cual es una enfermedad con una tasa de mortalidad de aproximadamente 28%, particularmente en los grupos más vulnerables. Está entre las ETA de mayor importancia para la salud pública, debido al impacto social y económico que tiene por la gravedad de su cuadro clínico (Muñoz et al., 2011). Debido a que es un patógeno, para poder realizar diferentes estudios microbiológicos se puede utilizar *Listeria innocua* como un sustituto no patogénico en lugar de *L. monocytogenes*, ya que se ha demostrado que presenta características de crecimiento y resistencia iguales o superiores a éste (Fernandes et al., 2013; Health Canada, 2012).

En productos como frutas y verduras, la contaminación microbiana puede suceder mientras crecen en los huertos o campos, durante la cosecha, la manipulación, el procesamiento y/o la distribución postcosecha (Beuchat, 1996). Se ha visto que pueden llegar a presentar una contaminación de distintos microorganismos en poblaciones de 10^3 a 10^7 ufc/g (Samadi et al., 2009), pudiendo existir presencia de patógenos capaces de causar enfermedades, ya sean bacterias, virus y/o parásitos. Es por esto que los tratamientos de higienización con productos desinfectantes adecuados pueden desempeñar un papel importante en la reducción de la microflora y la

eliminación de los microorganismos patógenos presentes, con el fin de asegurar el consumo de alimentos inocuos.

Los desinfectantes son agentes químicos que destruyen microorganismos y/o inhiben el crecimiento microbiano, pero no necesariamente eliminan las esporas. Se aplica sobre objetos y materiales inanimados, como utensilios, superficies, vegetales, etc. y en muchos casos su actividad se puede perder de manera parcial o total por la presencia de materia orgánica (Alba y Araujo, 2008; Martínez y Domínguez, 2013)

En el mercado existe una gran variedad de desinfectantes específicos para usar en el área de alimentos, los cuales deben cumplir con condiciones determinadas, para evitar una posible contaminación química, no alterar las cualidades organolépticas del producto y asegurar la desinfección. Algunos de los agentes desinfectantes utilizados en la desinfección de frutas y hortalizas son los compuestos halogenados, ácidos orgánicos, compuestos de amonio cuaternario, entre otros (Garmendia y Vero, 2006).

Los compuestos de amonio cuaternario (CAC) son un grupo de desinfectantes cuya estructura básica es el catión amonio (NH_4^+), en donde los cuatro hidrógenos unidos al átomo de nitrógeno han sido reemplazados por radicales orgánicos de variable complejidad. Los CAC con acción germicida poseen grupos orgánicos de cadena larga, observándose una mayor actividad en compuestos con grupos de 8 a 18 átomos de carbono de longitud (Murray et al., 2017). Son solubles en agua y en alcohol y pertenece al grupo de los tensioactivos catiónicos. Son ampliamente utilizados, ya que presentan una baja toxicidad y en general son muy eficientes frente a bacterias Gram positivas. Su modo de acción consiste en formar una unión irreversible a los fosfolípidos y proteínas presentes en la membrana de los microorganismos, dañando su permeabilidad (Rueda et al., 2003). Las cadenas carbonadas (parte apolar) presentes en su estructura les permite penetrar las membranas de los microorganismos, mientras que por el nitrógeno catiónico (parte polar) interaccionan con los fosfatos de los fosfolípidos, causando la salida al exterior del material vital citoplasmático (Rodríguez, 2015).

La modificación de los CAC en el tiempo ha logrado formar distintas generaciones del antiséptico, siendo el de primera generación el cloruro de benzalconio

(CB) (Diomedi, et al., 2017), también denominado cloruro de n-alquil dimetil bencil amonio, en donde la cadena alquílica que presenta en su estructura puede variar el número de átomos de carbonos. La concentración de CB a utilizar dependerá del grado de contaminación presente (Rodríguez, 2015). Su uso está recomendado para la sanitización utensilios y superficies, y, en nuestro país, está permitido para la desinfección de frutas y verduras, comercializándose productos de uso hogareños para ser utilizado, con este fin, en soluciones entre 100 y 200 ppm. Por el contrario, La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (USFDA) no aprueba el uso de CAC en contacto directo con los alimentos (USFDA, 2014), solo autoriza su uso en equipos y utensilios de procesamiento de alimentos y en otros artículos que estén en contacto con los alimentos, a una concentración de no más de 200 ppm de compuesto de amonio cuaternario activo (USFDA, 2017). Cabe mencionar que la Unión Europea (UE) establece que los niveles máximos de residuos (LMR) de CB permitido en productos es de 0,1 mg/kg (Reglamento UE, 2014), por lo que el uso de estas soluciones desinfectantes debe ser seguido por un enjuague adecuado.

Para poder determinar y comparar la acción y comportamiento biocida de los distintos desinfectantes se llevan a cabo estudios bactericidas, en donde se calculan indicadores numéricos, como el coeficiente de dilución (η), el cual relaciona distintas concentraciones del desinfectante con el tiempo al que se logra una misma reducción del número de microorganismos. Diferentes estudios han determinado distintos valores de η para relativamente pocos germicidas, y los resultados obtenidos han sido a menudo discordantes, además que hay que considerar que este valor no puede ser un número fijo, ya que hay que tener en cuenta distintos factores como la temperatura de trabajo, el tipo de microorganismo, entre otros (Cowles, 1940; Ioannou et al., 2007).

El presente estudio tiene como objetivo determinar el coeficiente de dilución para un producto desinfectante de uso doméstico que contiene cloruro de benzalconio, el cual es un compuesto de amonio cuaternario, frente a cepas de *Listeria innocua* y *Escherichia coli*.

IV. HIPÓTESIS

El coeficiente de dilución de un desinfectante difiere de acuerdo con el tipo de bacteria en estudio, la composición del producto y las condiciones de trabajo.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar el coeficiente de dilución de un desinfectante compuesto de amonio cuaternario de uso doméstico y de otros parámetros que den información de su acción bactericida frente a cepas de *Listeria innocua* y *Escherichia coli*.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto germicida del desinfectante frente a los distintos microorganismos, a diferentes tiempos y concentraciones.
- Calcular la eficiencia germicida del desinfectante, la velocidad específica de muerte y tiempo de reducción decimal para cada microorganismo.
- Calcular el coeficiente de dilución para cada microorganismo.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Insumos:

- Cepas: *Listeria innocua* y *Escherichia coli*
- Desinfectante comercial compuesto por **cloruro de benzalconio (10%)**.
- Medios de cultivo: Agar Soya Trypticasa (TSA), Caldo Soya Trypticasa (TSB).
- Neutralizante Universal (Álvarez et al., 2001):
 - Tween 80: 30 ml/100 ml
 - NaHSO₃: 6,25 ml (40%)
 - Na₂S₂O₃: 3,92 g
 - Diluyente c.s.p. 250 ml:
 - Peptona 1 g
 - NaCl 8,5 g
 - H₂O 1000 ml

Equipos:

- Autoclave ORTHAM.
- Estufa de cultivo Daihan Labtech Co. Ltda.
- Vortex Vision Scientific Co. Ltda.
- Otros equipos y materiales de trabajo del Laboratorio de Microbiología Aplicada de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Metodología de trabajo

Estandarización del recuento inicial de las cepas.

Se realizó por recuento en placa de Petri. Para ello se incubó 1 ml del cultivo puro por 24 h a 35°C en 9 ml de TSB, repitiendo el ensayo por 2 d consecutivos con el fin de estandarizar la cepa. Posteriormente se realizaron las diluciones decimales necesarias de este cultivo y se sembró 1 ml de cada dilución en placa y se les adicionó TSA, se incubó a 35°C durante 24 h (Arriagada, 2006).

Control de neutralizante

Utilizando la metodología recomendada por Sutton et al. (2002) se prepararon 2 tubos de ensayo, uno con 1 ml del biocida más 9 ml de neutralizante y otro con 1 ml de agua peptonada y 9 ml de neutralizante y se dejaron reposar por 10 min a temperatura ambiente. Se preparó un tercer tubo con 9 ml de agua peptonada como control. Luego estos tres tubos se inocularon con 1 ml del cultivo puro diluido a una concentración aproximada de 10^3 ufc/ml, se agitó cuidadosamente y se dejó reposar durante 10 min. Posteriormente, se realizó recuento en placa, incubando a 35°C durante 72 h.

Determinación de la acción bactericida in vitro del desinfectante

Se tomó una alícuota de 1 ml del cultivo puro de la cepa en estudio y se puso en contacto con 99 ml de desinfectante y se agitó continuamente. De esta suspensión se fue traspasando 1 ml a 9 ml de solución neutralizante a los 3, 5, y 10 min. Se realizaron diluciones decimales para efectuar el recuento de microorganismos sobrevivientes sembrando en placa Petri 1 ml de las últimas tres diluciones y adicionando TSA. Las placas se incubaron a 35°C durante 24 h – 48 h. Posteriormente, se efectuó el recuento de las colonias. Este procedimiento se realizó para el desinfectante a concentraciones de 100, 160 y 230 ppm.

Los ensayos se realizaron en triplicado y los resultados se expresaron como la media de éstos, calculándose también su desviación estándar. Con estos resultados se determinó:

a) Eficiencia germicida (%E), que corresponde al porcentaje de microorganismos que son destruidos por la acción del desinfectante, y se obtiene a partir de la siguiente expresión:

$$\%E = \left(\frac{N_0 - N_f}{N_0} \right) (100)$$

Donde:

N_0 = número de microorganismos iniciales.

N_f = número de microorganismos sobrevivientes al tiempo t .

b) Velocidad específica de muerte (k), que da cuenta de la cinética de muerte de los microorganismos de acuerdo con la expresión:

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

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.

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

c) Tiempo de reducción decimal (TRD), el cual indica el tiempo necesario para disminuir en un ciclo logarítmico la cantidad de microorganismos presentes en una muestra de ensayo y se determina con la siguiente expresión:

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

Donde:

k = velocidad específica de muerte.

d) Coeficiente de dilución, el cual representa la relación entre la concentración del desinfectante y el tiempo de acción para obtener una similar efectividad frente a un determinado microorganismo, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$C^n t = \text{Constante}$$

Donde:

C = concentración del desinfectante.

t = tiempo de acción para disminuir en un mismo número la contaminación de microorganismo.

η = coeficiente de dilución.

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

$$\eta = \frac{\log_{t_2} - \log_{t_1}}{\log_{C_1} - \log_{C_2}}$$

C_1 y C_2 son las concentraciones inferior y superior del desinfectante, mientras que t_1 y t_2 son los tiempos para C_1 y C_2 a los que se logra una misma disminución bacteriana (Alba y Araujo, 2008).

Análisis estadístico.

Se utilizó el software Statgraphics Centurion XVII para realizar un análisis de varianza para los valores de recuento de *Listeria innocua* y *Escherichia coli* obtenidos en este estudio, con un intervalo de confianza del 95%.

VII. RESULTADOS

Control del neutralizante

Tabla 1. Control del neutralizante

	<i>Escherichia coli</i> (ufc/ml)	<i>Listeria innocua</i> (ufc/ml)
Control	9,8 x 10 ^{8 a}	8,2 x 10 ^{8 a}
Neutralizante	9,8 x 10 ^{8 a}	8,3 x 10 ^{8 a}
Neutralizante + Desinfectante	9,7 x 10 ^{8 a}	8,3 x 10 ^{8 a}

Distintos superíndices en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa (valor- $P \leq 0,05$).

La evaluación del neutralizante se realizó utilizando los recuentos iniciales de las cepas de *Escherichia coli* y *Listeria innocua* como controles, los cuales fueron comparados con el recuento de estas bacterias al ser expuestas al neutralizante y otra que, además del neutralizante, se le agregó el desinfectante de amonio cuaternario.

En la tabla 1 se muestran los resultados promedio obtenidos en cada caso. Como se puede observar, los recuentos, para las dos cepas en estudio, fueron similares en los tres análisis mencionados, obteniéndose valores de $9,8 \times 10^8$ y $9,7 \times 10^8$ ufc/ml para *Escherichia coli* y de $8,2 \times 10^8$ y $8,3 \times 10^8$ ufc/ml para *Listeria innocua*.

Al realizar el análisis estadístico entre los recuentos obtenidos para cada cepa en estos tres casos, se obtuvo un valor- P mayor a 0,05, por lo que se comprobó que no existían diferencias significativas entre éstos, con un nivel de confianza del 95%. Por lo tanto, es posible determinar que el neutralizante utilizado cumple su función de inactivar al desinfectante sin presentar efecto bactericida sobre los microorganismos.

Acción bactericida in vitro del desinfectante

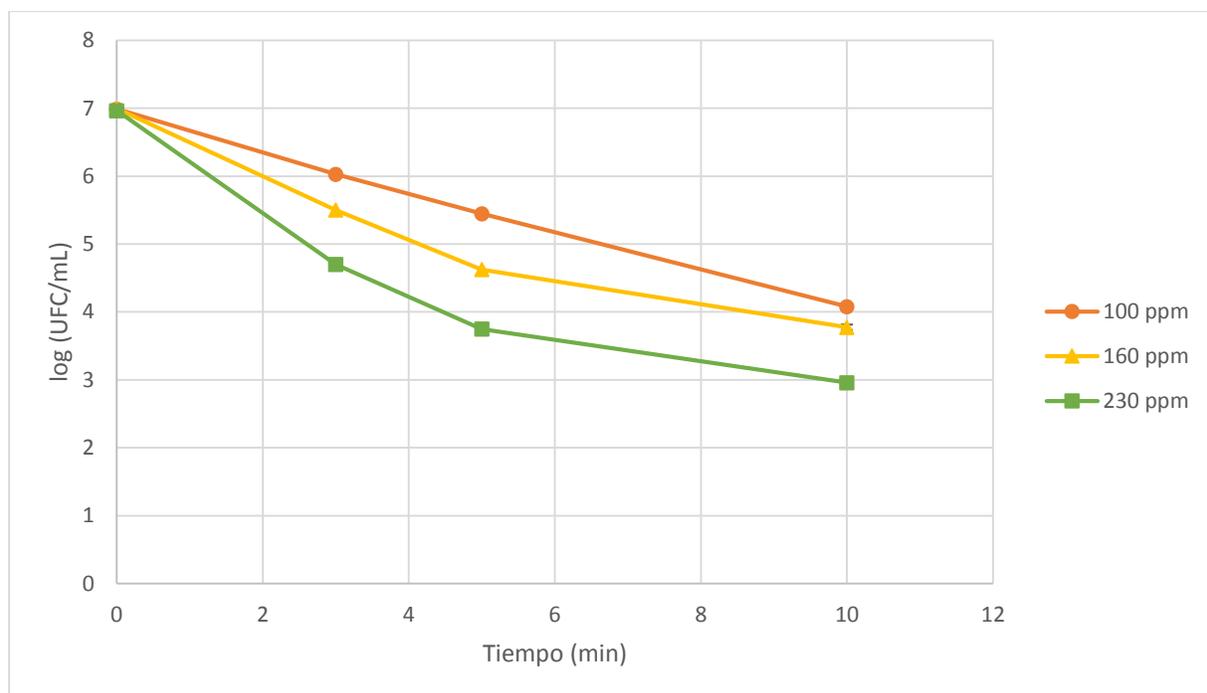


Figura 1. Efecto del desinfectante a concentraciones de 100, 160 y 230 ppm en *Escherichia coli* a diferentes tiempos.

En la figura 1 se presenta la cinética de muerte de *Escherichia coli* al utilizar el desinfectante en estudio a distintas concentraciones y tiempos de acción. Además, se muestra la desviación estándar entre los logaritmos de los recuentos para cada punto de medición.

Se puede observar que a la mayor concentración de 230 ppm solo se alcanzó una disminución de 4 ciclos logarítmicos. La concentración de 160 ppm presentó una disminución de 3 ciclos logarítmicos, mientras que la concentración menor de 100 ppm alcanzó a reducir solo 2 ciclos logarítmicos.

Cabe mencionar que la concentración indicada por el fabricante, de 160 ppm por 5 min, logró una reducción de solo 2 ciclos logarítmicos.

En la tabla 2 se presentan los resultados promedios obtenidos del recuento de *Escherichia coli* a distintos tiempos y concentraciones del desinfectante en estudio, junto con los cálculos de eficiencia germicida, velocidad específica de muerte y tiempo de reducción decimal correspondientes.

Tabla 2. Actividad germicida del desinfectante a distintas concentraciones sobre *Escherichia coli*

Concentración (ppm)	Tiempo (min)	N (UFC/ml)	E (%)	k (min ⁻¹)	TRD (min)
100 ^a	0 ^a	9,7 x10 ⁶			
	3 ^b	1,1 x10 ⁶	89,041	0,74	3,12
	5 ^c	2,8 x10 ⁵	97,123	0,71	3,24
	10 ^d	1,2 x10 ⁴	99,877	0,67	3,43
*160 ^{ab}	0 ^a	9,9 x10 ⁶			
	3 ^b	3,2 x10 ⁵	96,801	1,15	2,00
	**5 ^c	4,2 x10 ⁴	99,576	1,09	2,11
	10 ^d	6,0 x10 ³	99,940	0,74	3,10
230 ^b	0 ^a	9,3 x10 ⁶			
	3 ^b	5,0 x10 ⁴	99,459	1,74	1,32
	5 ^c	5,6 x10 ³	99,939	1,48	1,55
	10 ^d	9,1 x10 ²	99,990	0,92	2,49

*Concentración recomendada por el fabricante

**Tiempo de acción recomendado por el fabricante

Distintos superíndices en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa en los valores del recuento de microorganismos (valor-P≤0,05).

Como se puede observar en la tabla, a la menor concentración del desinfectante solo se alcanzó un 99% de eficiencia a los 10 min de acción, lo cual fue similar con lo obtenidos para la concentración indicada por el fabricante de 160 ppm entre los 5 y 10

min. La mayor eficiencia, que fue de un 99,99%, y se alcanzó a la concentración de 230 ppm por 10 min, los cuales eran los parámetros de estudio más altos.

Para la concentración y el tiempo de exposición recomendado por el fabricante se alcanzó una reducción de solo el 99%.

Según la USFDA (2013) un producto desinfectante eficaz debe lograr reducir las poblaciones de microorganismos en 5 ciclos logarítmicos, que es una reducción del 99,999%. Por lo tanto, según los resultados, a ninguna concentración se logra esta reducción.

En cuanto a la velocidad específica de muerte, para un mismo tiempo, a mayor concentración del desinfectante los valores de k van aumentando, lo que indicaría que al aumentar la concentración se disminuye a una mayor velocidad la población inicial del microorganismo. Mientras que para cada concentración los valores de k van siendo menores en el tiempo, por lo que la población restante va disminuyendo cada vez a una menor velocidad.

En el tiempo de reducción decimal los valores en cada concentración fueron aumentando, por lo que cada vez se necesitaba más tiempo para poder disminuir en un ciclo logarítmico la cantidad de microorganismos que iban quedando. Mientras que al aumentar la concentración del desinfectante se obtuvieron valores menores para un mismo tiempo, lo que quiere decir que al aumentar la concentración se necesita menos tiempo para lograr una misma reducción.

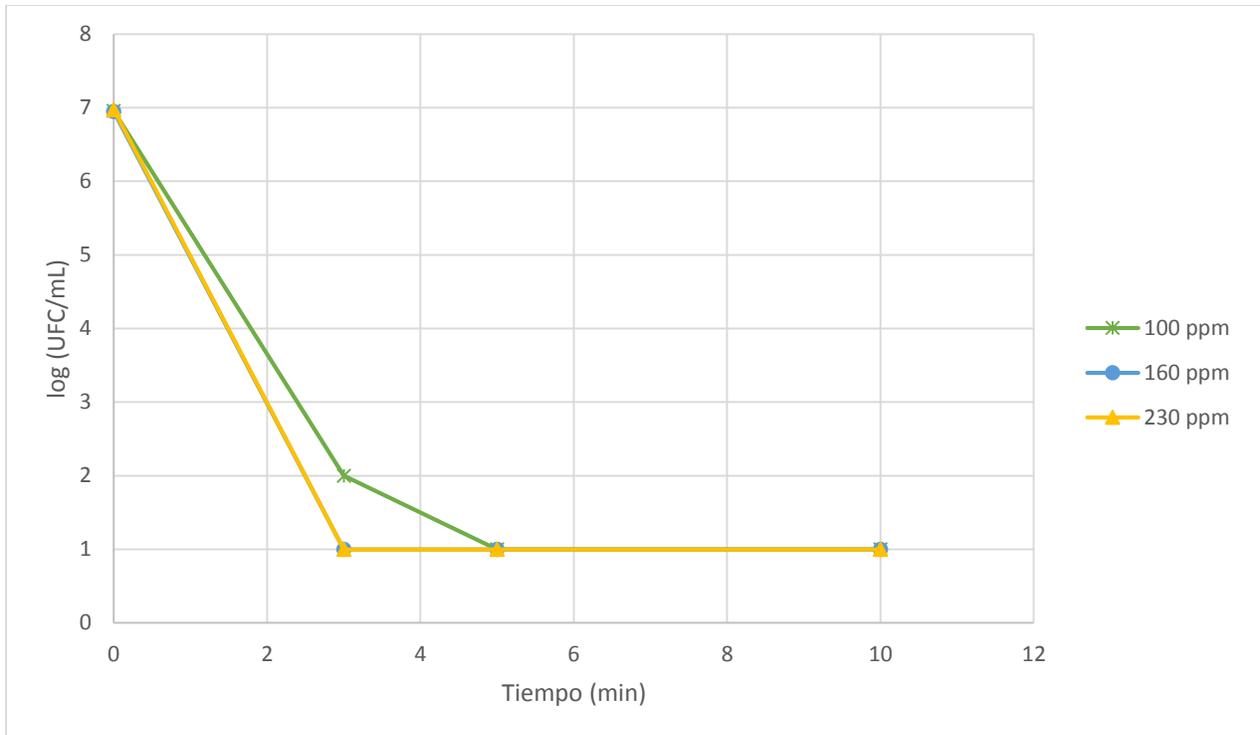


Figura 2. Efecto del desinfectante a concentraciones de 100, 160 y 230 ppm en *Listeria innocua* a diferentes tiempos.

La figura 2 muestra la cinética de muerte de *Listeria innocua* frente al desinfectante de amonio cuaternario utilizado a diferentes concentraciones durante tiempos de acción definidos. Junto a cada punto de medición se agregó la desviación estándar del logaritmo de los valores obtenidos en ese recuento.

Como se puede observar, a las concentraciones más altas utilizadas del desinfectante, de 160 y 230 ppm, se alcanzó una reducción 6 ciclos logarítmicos a los 3 min de acción, mientras que para la concentración menor de 100 ppm la misma disminución se logró a los 5 min y a los 3 min presentó una reducción de 5 ciclos logarítmicos.

Los datos que se presentan en la tabla 3 corresponden a los promedios obtenidos del recuento de *Listeria innocua* para cada tiempo de medición a las distintas concentraciones del desinfectante, junto con los valores calculados de la eficiencia germicida, velocidad específica de muerte y tiempo de reducción decimal correspondientes.

Tabla 3. Actividad germicida del desinfectante a distintas concentraciones sobre *Listeria innocua*

Concentración (ppm)	Tiempo (min)	N (UFC/ml)	E (%)	K (min ⁻¹)	TRD (min)
100 ^a	0 ^a	9,1 x 10 ⁶			
	3 ^b	1,0 x 10 ²	99,9988	3,04	0,76
	5 ^b	<1,0 x 10 ¹	99,9998	1,82	1,26
	10 ^b	<1,0 x 10 ¹	99,9998	0,91	2,52
*160 ^a	0 ^a	8,9 x 10 ⁶			
	3 ^b	<1,0 x 10 ¹	99,9998	3,03	0,76
	**5 ^b	<1,0 x 10 ¹	99,9998	1,82	1,27
	10 ^b	<1,0 x 10 ¹	99,9998	0,91	2,53
230 ^a	0 ^a	9,4 x 10 ⁶			
	3 ^b	<1,0 x 10 ¹	99,9998	3,05	0,75
	5 ^b	<1,0 x 10 ¹	99,9998	1,83	1,26
	10 ^b	<1,0 x 10 ¹	99,9998	0,91	2,51

*Concentración recomendada por el fabricante

**Tiempo de acción recomendado por el fabricante

Distintos superíndices en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa en los valores del recuento de microorganismos (valor-P≤0,05).

Como se puede observar, en todas las concentraciones se alcanza una eficiencia mayor a 99,999%, en el caso de concentraciones más altas, de 230 y 160 ppm, está se alcanza a los 3 min, y a los 5 min para la de concentración menor utilizada.

En cuanto a la cinética de muerte y al tiempo de reducción decimal, al obtenerse recuentos parecidos, los valores obtenidos son similares para las tres concentraciones, y se comportan de manera similar a los de la tabla 2, los valores de k disminuyen en el tiempo, mientras que el TRD aumenta.

Determinación del coeficiente de dilución (η)

Tabla 4. Coeficiente de dilución para *Escherichia coli* y *Listeria innocua*

Coeficiente de dilución	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria innocua</i>
	1,1	0,04

La tabla 4 muestra los valores del coeficiente de dilución calculados para cada microorganismo en estudio, frente al desinfectante de amonio cuaternario.

Para *Escherichia coli* se obtuvo un valor de 1,1, mientras que para *Listeria innocua* se determinó un valor mucho menor de 0,04.

Análisis estadístico.

El Anexo I muestra los resultados del análisis de varianza ANOVA simple para los datos de la prueba del neutralizante. Se utilizó como factor las muestras (Neutralizante+Biocida, Neutralizante y Control) y como variable dependiente el logaritmo de la media del recuento de cada muestra, todo esto se realizó por separado para las distintas cepas en estudio. Se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras, con un nivel de confianza del 95%, ni para *E. coli* ni para *L. innocua*.

En el Anexo II se presentan los análisis realizados a los datos utilizados para determinar la acción germicida del desinfectante. En este caso, para cada bacteria del estudio se utilizó la media del logaritmo del recuento como variable dependiente y los factores analizados fueron el tiempo de acción y la concentración del desinfectante.

Para *E. coli*, ambos factores obtuvieron un valor-P menor a 0,05, por ende, presentaron diferencias estadísticamente significativas, con un 95% de nivel de confianza. El factor concentración solo presentó diferencias significativas entre las concentraciones de 100 ppm y 230 ppm, Mientras que el factor tiempo de acción presentó diferencias significativas en todos los puntos de medición.

En el caso de *L. innocua*, solo el factor tiempo presentó diferencias estadísticamente significativas, con un nivel de confianza del 95%. Esto se debe a la diferencia de recuento entre el tiempo 0 y todos los otros tiempos analizados, en donde se obtuvo una rápida disminución de los microorganismos sobrevivientes.

VIII. DISCUSIÓN

Tabla 5. Resumen de la eficiencia germicida del desinfectante frente a los microorganismos en estudio.

Concentración (ppm)	Tiempo (min)	E (%)	
		<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>
100	3	89,0411	99,9989
	5	97,1233	99,9999
	10	99,8767	99,9999
160*	3	96,8013	99,9999
	5**	99,5758	99,9999
	10	99,9399	99,9999
230	3	99,4595	99,9999
	5	99,9395	99,9999
	10	99,9902	99,9999

*Concentración recomendada por el fabricante

**Tiempo de acción recomendado por el fabricante

Existen varios estudios realizados con compuestos de amonio cuaternario en donde se ha determinado que presentan una mayor eficiencia frente a bacterias Gram positivas que frente a Gram negativas (Chaidez et al, 2007; Fazlara y Ekhtelat, 2012; Rueda et al., 2003). Rueda et al. (2003) obtuvieron concentraciones efectivas para el cloruro de benzalconio de 1380 ppm frente a *Escherichia coli* y de 3100 ppm para *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que para *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* fueron de 300 y 210 ppm, respectivamente, lo cual indicaría que la efectividad puede llegar a ser hasta 10 veces mayor para Gram positivas. Fazlara y Ekhtelat (2012) obtuvieron resultados similares a lo planteado, donde las bacterias Gram positivas estudiadas fueron más sensibles que las Gram negativas, a excepción del *Bacillus cereus*, debido a su capacidad para formar esporas.

Esta diferencia en la efectividad concuerda con los resultados de eficiencia obtenidos en este estudio y que se muestran en la tabla 5, en donde el desinfectante a la menor concentración frente a *Listeria innocua* presenta una reducción de 6 ciclos logarítmicos a los 5 min de acción, mientras que para *Escherichia coli* a la mayor concentración y a los 10 min de acción logró solo una reducción de 4 ciclos logarítmicos y no de 5 ciclos (eficiencia de 99,999%), que es lo que se espera para considerar efectivo un producto desinfectante (USFDA, 2013)

Para corroborar la mayor acción desinfectante frente a un tipo de microorganismos, se resume en la tabla 6 los resultados de la velocidad específica de muerte, la cual siempre es mayor para la cepa de *Listeria innocua*, lo que indica que esta bacteria Gram positiva disminuye a una velocidad mayor su población inicial, al compararla con la cepa del microorganismo Gram negativas utilizado.

Tabla 6. Resumen de la velocidad específica de muerte de los microorganismos en estudio frente al desinfectante a base de amonio cuaternario.

Concentración (ppm)	Tiempo (min)	k (min ⁻¹)	
		<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>
100	3	0,74	3,04
	5	0,71	1,82
	10	0,67	0,91
160*	3	1,15	3,03
	5**	1,09	1,82
	10	0,74	0,91
230	3	1,74	3,05
	5	1,48	1,83
	10	0,91	0,92

*Concentración recomendada por el fabricante

**Tiempo de acción recomendado por el fabricante

La diferencia en la respuesta que presentan las bacterias frente al desinfectante se puede deber a las diferencias en sus estructuras celulares, composición y fisiología (Bragg et al., 2014).

Según la literatura, existen dos mecanismos de resistencia a los desinfectantes: la resistencia intrínseca y la adquirida. La primera es la capacidad natural de las células bacterianas para tener una sensibilidad reducida a ciertos agentes. En el caso de las bacterias Gram negativas, éstas presentan en su estructura una membrana externa, la cual es una bicapa asimétrica con una parte interna que consiste en fosfolípidos y otra externa, cuyo componente principal son los lipopolisacáridos (LPS). Las moléculas de LPS interactúan entre sí en la superficie celular formando una barrera de permeabilidad, lo que restringe el acceso de biocidas hidrófobos, y así permite que las bacterias Gram negativas sobrevivan en ambientes hostiles (Zhang et al., 2013). Otra forma de resistencia intrínseca es la formación de biofilms por parte de algunos microorganismos, lo cual reduce la sensibilidad hacia el desinfectante. También se ha visto que la actividad del cloruro de benzalconio se ve reducida frente a bacterias que forman esporas, como *Bacillus cereus* (Bragg et al., 2014; Fazlara y Ekhtelat, 2012).

El otro mecanismo de resistencia es el adquirido, el cual resulta de mutaciones de genes celulares o por la adquisición de información genética externa. Una de las posibles causas de esto es el reiterado contacto con el biocida, por lo que se sugiere que exista a nivel industrial una rotación constante del tipo de desinfectante que se use. Sin embargo, se ha visto que la adaptación cruzada con otros desinfectantes diferentes a CAC es responsable de reforzar la supervivencia de las bacterias (Bragg et al., 2014; Diomedi et al., 2016; Ruiz-Bolivar et al. 2008).

En la tabla 7 se muestran el resumen de los valores del TRD calculados para cada tiempo y concentración. Como se puede ver, las mayores diferencias se presentan en la menor concentración, donde la cepa de *L. innocua* a los 3 min requiere alrededor de un cuarto del tiempo que necesita la cepa de *E. coli* para reducir en un ciclo logarítmico la cantidad de microorganismos restantes.

Tabla 7. Resumen del tiempo de reducción decimal y coeficiente de dilución del desinfectante frente a los microorganismos en estudio.

Concentración (ppm)	Tiempo (min)	TRD (min)		η	
		<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>
100	3	3,12	0,76	1,1	0,04
	5	3,24	1,26		
	10	3,43	2,52		
160*	3	2,00	0,76		
	5**	2,11	1,27		
	10	3,10	2,53		
230	3	1,32	0,75		
	5	1,55	1,26		
	10	2,51	2,49		

*Concentración recomendada por el fabricante

**Tiempo de acción recomendado por el fabricante.

En la tabla 7 también se presentan 2 valores distintos de coeficiente de dilución (η) para el mismo desinfectante, por lo que los cambios en la concentración de éste harán variar la actividad germicida en potencia del valor del η calculado para cada bacteria en estudio (Denyer y Baird, 2007).

En el caso del desinfectante frente a *Listeria innocua*, se obtuvo un coeficiente de dilución de 0,04, lo cual indica que si el producto se aumenta al doble de la concentración sugerida por el fabricante, la actividad aumentaría cerca de un 3%.

Por otro lado, el coeficiente de dilución para *Escherichia coli* fue de 1,1, es decir, un aumento al doble de la concentración indicada aumentaría cerca de un 54% la actividad del desinfectante. Por lo tanto, variar la concentración del producto podría generar efectos más significativos en la eficiencia germicida, que aumentar el tiempo de acción.

Tabla 8. Resumen de los resultados del desinfectante a la concentración y tiempo recomendado por el fabricante (160 ppm por 5 min)

	E (%)	k (min ⁻¹)	TRD (min)
<i>Escherichia coli</i>	99,5758	1,09	2,11
<i>Listeria innocua</i>	99,9999	1,82	1,27

De acuerdo con la tabla 8, al tiempo de acción y concentración que indica el envase, el desinfectante frente a la cepa de *Listeria innocua* presentó una eficiencia de 99,9999%, es decir, se logró una reducción de 6 ciclos logarítmicos, mientras que frente a la cepa de *Escherichia coli* solo logró una reducción de 2 ciclos logarítmicos, con un tiempo de reducción decimal de 2,1 min, lo cual significa que para lograr la reducción de 5 ciclos logarítmicos se necesitarían cerca de 10 min. Estos resultados para la *Escherichia coli* sugieren que a las recomendaciones establecidas por el fabricante la acción del biocida sería insuficiente para lograr una desinfección que asegure la inocuidad.

En estudios realizados por Rueda et al. (2003) en donde utilizaron el cloruro de benzalconio en estado puro diluido con agua destilada, se obtuvo una concentración efectiva del desinfectante para distintas cepas de *E. coli* entre 750 ppm y 1000 ppm, mayor a lo utilizado en este trabajo y a lo recomendado por el fabricante. Este valor de concentración efectiva podría resultar mucho mayor en el caso de los experimentos realizados en este estudio, ya que además de utilizar un producto comercial, las diluciones fueron hechas con agua potable, la cual presenta durezas que disminuyen la actividad del desinfectante frente a los agentes bacterianos (Rodríguez, 2015).

En base a lo mencionado anteriormente, según el estudio de Rueda et al. (2003) se podría sugerir aumentar la concentración de cloruro de benzalconio a modo de mejorar la eficiencia del desinfectante frente a distintos tipos de microorganismos, pero es importante mencionar que los compuestos de amonio cuaternario pueden presentar efectos adversos, como irritación a la piel y mucosa, especialmente si se utilizan a altas

concentraciones. Su ingesta accidental puede provocar náuseas, vómitos y dolor abdominal (Diomedi et al., 2016). Por esta razón, se hace importante seguir las indicaciones dadas por el fabricante y no excederlas, a modo de evitar una posible contaminación química. Hay que recordar que el uso de estas soluciones desinfectantes debe ser seguido de un enjuague adecuado, con el fin de no superar el nivel máximo de residuos establecido por la UE de 0,1 mg/kg (Reglamento UE, 2014).

Aunque el desinfectante resultó ser muy eficiente frente a la cepa de *Listeria innocua* estudiada, en la que se alcanzó una reducción efectiva del número de contaminantes a una concentración menor de lo indicada en el envase, este producto señala en su etiqueta que es recomendado para la desinfección de utensilios de cocina, frutas, verduras y huevos, los cuales pueden llegar a presentar un amplio rango de microorganismos (Beuchat, 1996). Estudios realizados en la desinfección de vegetales con el mismo producto, mostraron que este desinfectante no disminuye considerablemente la contaminación presente, alcanzando una reducción de solo 0,5 ciclos logarítmicos (López et al, 2003), lo cual se pudo deber a la posible formación de biofilm bacterianos o también a la topografía superficial del vegetal o al hecho de que estos desinfectantes disminuyen su actividad cuando hay presencia de material orgánico.

Otras investigaciones determinaron que entre un 10% a un 46% de cepas de *Listeria monocytogenes* que se aislaron de alimentos y de lugares en donde se procesan alimentos presentaron resistencia al cloruro de benzalconio (Müller et al., 2013). Esto indicaría que no es posible establecer un coeficiente de dilución específico para cada desinfectante, ya que la actividad de éste va a verse afectada, no solo si la bacteria es Gram positiva o negativa, sino también por la posible resistencia que puedan presentar ciertas cepas de una misma especie al biocida.

En diferentes estudios comparativos entre compuestos de amonio cuaternario de distintas generaciones (Ioannou et al, 2007; Rueda et al. 2003) se puede determinar una mayor eficiencia en generaciones mayores que la obtenida por el cloruro de benzalconio (primera generación). En el trabajo realizado por Rueda et al. (2003) se determinó que para lograr un mismo efecto germicida se necesitan concentraciones de

compuesto de amonio cuaternario de segunda generación diez veces menores a las concentraciones que se requieren de cloruro de benzalconio, en donde además se vio que las recomendaciones de tiempo y concentración del fabricante para el desinfectante de segunda generación resultaron ser eficaces frente a los distintos microorganismos analizados.

IX. CONCLUSIONES

El desinfectante de uso doméstico utilizado, cuyo principio activo es el cloruro de benzalconio, presentó una mayor efectividad frente a *L. innocua*, logrando una disminución de 5 ciclos logarítmicos a la menor concentración del desinfectante (100 ppm) a los 3 min de acción. Mientras que para *E. coli* a los parámetros más altos utilizados en ese estudio (230 ppm por 10 min), solo se alcanzó una reducción de 4 ciclos logarítmicos.

El coeficiente de dilución del desinfectante frente a *L. innocua* fue de 0,04, mientras que para la cepa de *E. coli* fue de 1,1, por lo que se demostró que este valor va a diferir dependiendo del tipo de bacteria analizada.

Los valores de k y TRD obtenidos corroboraron una mayor acción germicida del desinfectante frente a la cepa de *L. innocua*.

A los parámetros de concentración y tiempo indicados por el fabricante (160 ppm, 5 min), el desinfectante frente a la cepa de *L. innocua* presentó una eficiencia del 99,9999%, mientras que frente a la cepa de *E. coli* solo logró una reducción de 2 ciclos logarítmicos. Por lo tanto, se determinó que este desinfectante presenta una mayor eficiencia frente a la cepa de bacteria Gram positiva que en la Gram negativa estudiada.

X. REFERENCIAS

1. **Alba, N.** y Araujo, F. (2008) Evaluación de los Desinfectantes Utilizados en el Proceso de Limpieza y Desinfección del Área de Fitoterapéuticos en Laboratorios PRONABELL Ltda. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
2. **Álvarez A.**, Rodríguez, E., Gálvez, R. (2001) Valoración de desinfectantes. Método de dilución –neutralización, Hig. San. Amb. 1: 1-5.
3. **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.
4. **Beuchat L.** (1996) Pathogenic microorganisms associated with fresh produces. J. Food Prot., 59: 204-216
5. **Bragg, R.**, Jansen, A., Coetzee, M., Van der Westhuizen, W., Boucher ,C. (2014) Bacterial resistance to quaternary ammonium compounds (QAC) disinfectants. Adv Exp Med Biol., 808: 1-13
6. **Chaidez, C.**, Lopez, J. y Castro-del Campo, N. (2007) Quaternary ammonium compounds: an alternative disinfection method for fresh produce wash water. Journal of Water and Health. 05(2): 329-333
7. **Cowles, P.** (1940) The Disinfection Concentration Exponent. Yale J Biol Med. 12(6): 697–704.
8. **Denyer, S.** y Baird, R. (2007) Guide to microbiological control in pharmaceuticals and medical devices (2nd ed.), CRC Press, 325- 327
9. **Diomedi, A.**, Chacón, E., Delpiano, L., Hervé, B., Jemenao, M., Medel, M., Quintanilla, M., Riedel, G., Tinoco. y Cifuentes, M. (2017). Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones

Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. Revista Chilena de Infectología, 34(2): 156-174.

10. **Fazlara, A.** y Ekhtelat, M. (2012) The Disinfectant Effects of Benzalkonium Chloride on Some Important Foodborne Pathogens. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 12 (1): 23-29.
11. **Fernandes, M.,** Cruz, A., Dias, D., Faria, J., Marcelo C., Sant'Ana, A. (2013) On the behavior of *Listeria innocua* and *Lactobacillus acidophilus* co-inoculated in a dairy dessert and the potential impacts on food safety and product's functionality. Food Control, 34(2):331-335.
12. **Garmendia, G.** y Vero, S. (2006) Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. Horticultura, 197: 18-27.
13. **Health Canada** (2012) *Listeria monocytogenes* challenge testing of refrigerated ready-to-eat foods. [En línea] <<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/legislation-guidelines/policies/listeria-monocytogenes-challenge-testing-refrigerated-ready-foods-2012.html>> [Consulta: 29 de mayo 2018]
14. **Ioannou, C.,** Hanlon, G., Denyer. S. (2007) Action of Disinfectant Quaternary Ammonium Compounds against *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 51(1): 296–306.
15. **Kopper, G.,** Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., Gutiérrez, G. (2009) Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudio de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Informe Técnico sobre Ingeniería Agrícola y Alimentaria. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
16. **Lim, E. S.,** Lee, J. E., Kim, J. S., Koo, O. K. (2017). Isolation of indigenous bacteria from a cafeteria kitchen and their biofilm formation and disinfectant susceptibility, LWT - Food Science and Technology, 77: 376-382.

17. **López, L.**, Romero, J., Duarte F. (2003). Calidad microbiológica y efecto del lavado y desinfección en vegetales pretrozados expendidos en Chile. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 53(4): 383-388.
18. **Martínez, M.** y Domínguez, J. (2013) Guía de antisépticos y desinfectantes, Hospital Universitario de Ceuta. Instituto Nacional de Gestión Sanitaria. [En línea] <http://www.ingesa.msssi.gob.es/estadEstudios/documPublica/internet/pdf/Guia_Antisepticos_desinfectantes.pdf> [Consulta: 20 de enero 2018]
19. **Milan, C.**, Agostinetti, A., Conceição, R.C.S., Gonzalez, H.L., Timm, C.D. (2015). Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat products. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 67(2): 642-646.
20. **MINSAL** (Ministerio de Salud), 2018. Boletín Epidemiológico Trimestral [En línea] <http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2018/05/BET_ETA_MARZO_2018.pdf> [Consulta: 14 de mayo 2018]
21. **Müller, A.**, Rychli, K., Muhterem-Uyar, M., Zaiser, A., Stessl, B., Guinane C., Cotter, P., Wagner, M., Schmitz-Esser, S. (2013) Tn6188 - A Novel Transposon in *Listeria monocytogenes* Responsible for Tolerance to Benzalkonium Chloride. PLoS ONE, 8(10)
22. **Muñoz, A.**, Vargas, M., Otero, L., Díaz, G., Guzmán, V. (2011) Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008. Biomédica, 31:428-439.
23. **Murray, P.**, Rosenthal, K. and Pfaller, M. (2017) Microbiología médica. 8ª edición. Editorial Elsevier. Barcelona, España.
24. **Nazar, C.** (2007) Biofilms bacterianos. Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello, 67(1): 161-172
25. **OPS/OMS** (Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud) (2015) Control sanitario [En línea] <

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10553&Itemid=41280&lang=es# > [Consulta: 10 de mayo 2018]

26. **Ordoñez, R.**, Rivera, J., Yépez, M., Zúñiga, L. (2017) Análisis de microorganismos indicadores de contaminación de alimentos en cerdo al horno (hornado) vendido en un mercado municipal de la ciudad de Quito. *Centro de Biotecnología*, 6:72-81.
27. **Reglamento Unión Europea** (2014) Que modifica el anexo III del Reglamento (CE) n ° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los límites máximos de residuos de cloruro de benzalconio y cloruro de didecildimetilamonio en determinados productos. *Diario Oficial de la Unión Europea*. L304: 43-74
28. **Rodríguez E.** (2015) Consideraciones importantes en el uso de desinfectantes. Instituto de Salud Pública. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. [En línea] <<http://www.ispch.cl/sites/default/files/NotaTecnica%20N%C2%B0%20025%20Consideraciones%20Importantes.pdf>> [Consulta: 28 de marzo 2018]
29. **Rojas, C.** (2007) Evaluación de cuatro desinfectantes sobre *Listeria monocytogenes* aislada de productos cárnicos crudos de una planta de procesados en Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad De Ciencias. Microbiología Industrial. Bogotá
30. **Rueda, J.**, Lázaro. A., Ducha, J. (2003). Evaluación de Desinfectantes de amonio cuaternario sobre cepas bacterianas de origen animal. *Revue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties*, 22 (3): 1097-1104.
31. **Samadi, N.**, Abadian, N., Bakhtiari, D., Fazeli, M., Jamalifar, H. (2009) Efficacy of detergents and fresh produce disinfectants against microorganisms associated with mixed raw vegetables. *J Food Prot*, 72(7):1486-1490.
32. **Sutton, S.**, Proud, D., Rachui, S., Brannan, D. (2002) Validation of Microbial Recovery from Disinfectants. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 56(5): 255-266.
33. **Ulloa, M.** (2016). Enfermedades Transmitidas por los Alimentos en Chile: Agentes Causantes y Factores Contribuyentes Asociados a Brotes ocurridos durante el año

2013. Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Alimentos mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

34. **USFDA** (Food and Drug Administration) (2013) Food Code. U.S. Department of Health and Human Services [En línea] <<https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodCode/ucm374275.htm>> [Consulta: 29 de mayo 2018]
35. **USFDA** (Food and Drug Administration) (2014) Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce [En línea] <<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/ucm091363.htm>> [Consulta: 19 de mayo 2018]
36. **USFDA** (Food and Drug Administration) (2017) Department of Health and Human Services. Title 21, Volume 3, Sec 178.1010 [En línea] <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=178.1010>> [Consulta: 07 de mayo 2018]
37. **Zhang, G.**, Meredith, T. C. y Kahne, D. (2013). On the Essentiality of Lipopolysaccharide to Gram-Negative Bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 16(6): 779–785.

ANEXOS

I. Análisis de varianzas simple para la prueba del neutralizante.

A) *Escherichia coli*

Tabla ANOVA para log Recuento *E.coli* por Muestras

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0000200475	2	0.0000100237	0.60	0.6032
Intra grupos	0.0000500152	3	0.0000166717		
Total (Corr.)	0.0000700627	5			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de log Recuento *E.coli* en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0.601242, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de log Recuento *E. coli* entre un nivel de Muestras y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para log Recuento *E.coli* por Muestras

Método: 95.0 porcentaje LSD

Muestras	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Neutralizante+Biocida	2	8.98675	X
Peptonada	2	8.989	X
Neutralizante+Peptonada	2	8.99123	X

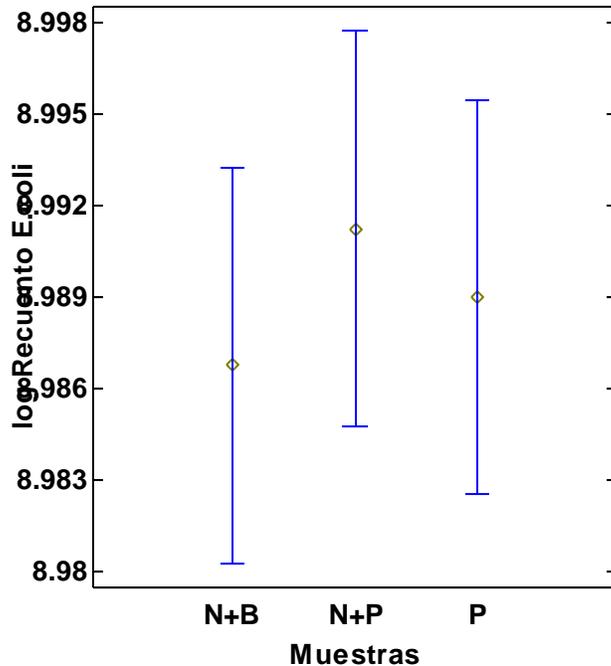
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Neutralizante+Biocida - Neutralizante+Peptonada		-0.00447742	0.0129943
Neutralizante+Biocida - Peptonada		-0.00225025	0.0129943
Neutralizante+Peptonada - Peptonada		0.00222717	0.0129943

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. No hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Medias y 95.0% de Fisher LSD



B) *Listeria Innocua*

Tabla ANOVA para log Recuento *L. innocua* por Muestras

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.00006523	2	0.000032615	3.49	0.1649
Intra grupos	0.0000280543	3	0.00000935145		
Total (Corr.)	0.0000932843	5			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de log Recuento *L. innocua* en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 3.48769, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de log Recuento *L. innocua* entre un nivel de Muestras y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para log Recuento *L. innocua* por Muestras

Método: 95.0 porcentaje LSD

Muestras	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Peptonada	2	8.91115	X
Neutralizante+Peptonada	2	8.91645	X
Neutralizante+Biocida	2	8.91908	X

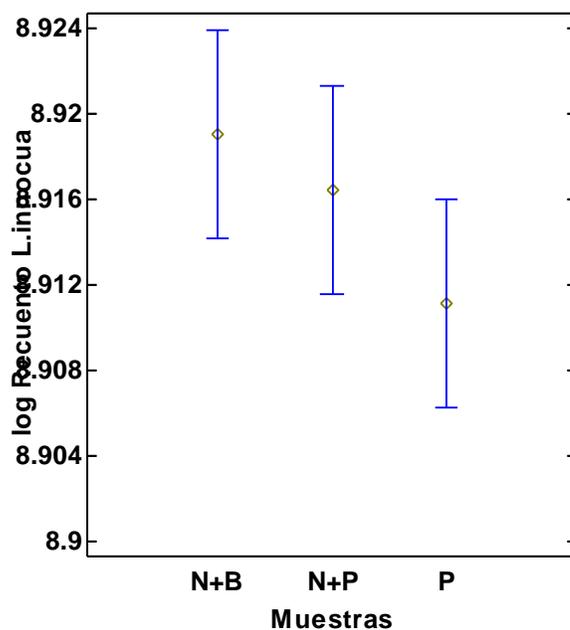
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Neutralizante+Biocida - Neutralizante+Peptonada		0.00263212	0.00973197
Neutralizante+Biocida - Peptonada		0.00792866	0.00973197
Neutralizante+Peptonada - Peptonada		0.00529654	0.00973197

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. No hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Medias y 95.0% de Fisher LSD



II. Análisis de varianza multifactorial para los datos utilizados para determinar la acción germicida.

A) *Escherichia coli*

Análisis de Varianza para log Recuento *E.coli* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo	18.3402	3	6.11341	45.56	0.0002
B:Concentración	2.20567	2	1.10284	8.22	0.0191
RESIDUOS	0.80506	6	0.134177		
TOTAL (CORREGIDO)	21.351	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de log Recuento en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre log Recuento con un 95.0% de nivel de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para log Recuento de *E. coli* por Tiempo

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10	3	3.60425	0.211484	X
5	3	4.6062	0.211484	X
3	3	5.4092	0.211484	X
0	3	6.98335	0.211484	X

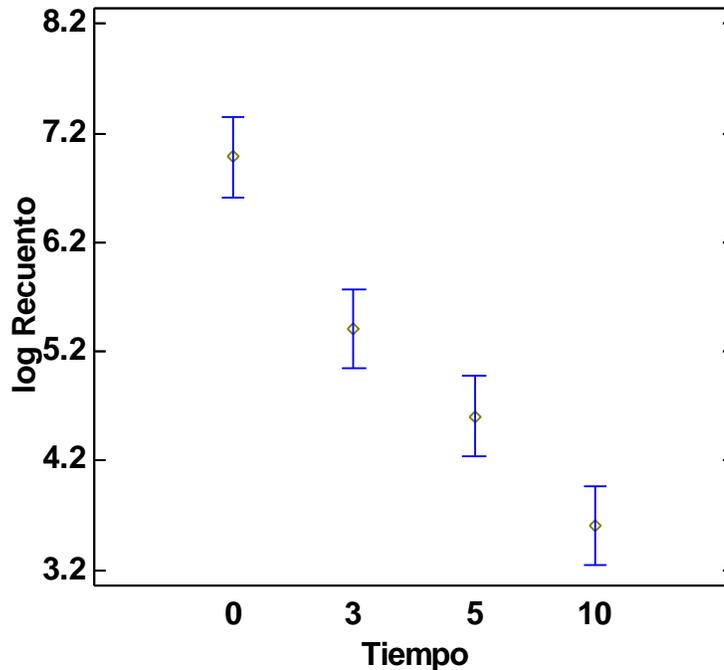
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3	*	1.57415	0.731834
0 - 5	*	2.37715	0.731834
0 - 10	*	3.3791	0.731834
3 - 5	*	0.803002	0.731834
3 - 10	*	1.80495	0.731834
5 - 10	*	1.00195	0.731834

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para log Recuento de *E. coli* por Concentración del desinfectante

Método: 95.0 porcentaje LSD

Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
230	4	4.59309	0.183151	X
160	4	5.2235	0.183151	XX
100	4	5.63566	0.183151	X

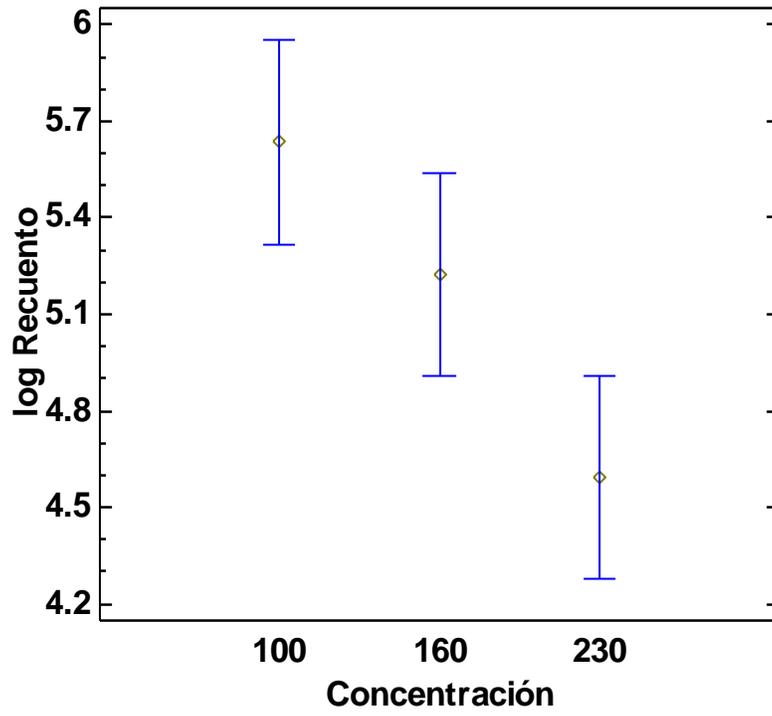
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100 - 160		0.412156	0.633787
100 - 230	*	1.04257	0.633787
160 - 230		0.630416	0.633787

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Medias y 95.0% de Fisher LSD



B) *Listeria innocua*

Análisis de Varianza para log Recuento *L. innocua* - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tiempo 2	77.1648	3	25.7216	307.80	0.0000
B: Concentración 2	0.165625	2	0.0828126	0.99	0.4247
RESIDUOS	0.501392	6	0.0835653		
TOTAL (CORREGIDO)	77.8318	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de log Recuento 2 en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre log Recuento 2 con un 95.0% de nivel de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para log *L. innocua* por Tiempo de Acción

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tiempo 2	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
5	3	1.0	0.166898	X
10	3	1.0	0.166898	X
3	3	1.33333	0.166898	X
0	3	6.95891	0.166898	X

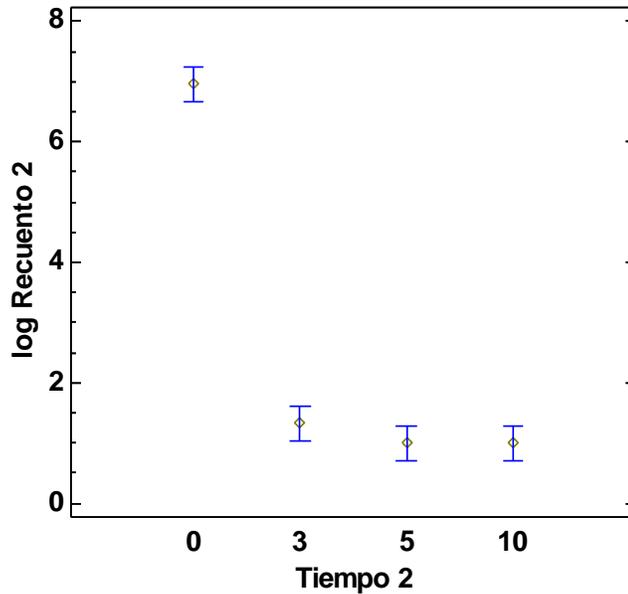
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3	*	5.62557	0.577546
0 - 5	*	5.95891	0.577546
0 - 10	*	5.95891	0.577546
3 - 5		0.333333	0.577546
3 - 10		0.333333	0.577546
5 - 10		0	0.577546

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para log Recuento *L. innocua* por Concentración del desinfectante

Método: 95.0 porcentaje LSD

Concentración 2	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
160	4	2.48674	0.144538	X
230	4	2.49328	0.144538	X
100	4	2.73916	0.144538	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100 - 160		0.252426	0.50017
100 - 230		0.24588	0.50017
160 - 230		-0.00654615	0.50017

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. No hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Medias y 95.0% de Fisher LSD

