



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

Efecto bactericida de un yodóforo sobre una superficie de acero inoxidable

José Romero Reyes

Patrocinante y Director

Químico (UCh)

Luis López Valladares

Director

Químico Farmacéutico (UCh)

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

Juan José Almonte Mondaca

Santiago, Chile

2019

Tabla de contenido

Resumen.....	1
Summary	2
Introducción	3
Hipótesis.....	7
Objetivo General	7
Objetivos específicos.....	7
Materiales y Métodos	8
Insumos	8
Equipos.....	8
Metodología.....	9
Estandarización y recuento de las cepas:.....	9
Control del neutralizante:	9
Determinación <i>in vitro</i> de la actividad bactericida óptima:	10
Evaluación <i>in vivo</i> sobre una superficie de acero inoxidable, de los resultados obtenidos <i>in vitro</i> :	10
Cálculos:	12
Análisis estadístico:	14
Resultados	15
Estandarización y control de neutralizante.....	15
Acción bactericida <i>in vitro</i> sobre <i>Escherichia coli</i>	16
Acción bactericida <i>in vitro</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	19
Acción bactericida <i>in vivo</i> sobre <i>Escherichia coli</i>	22
Acción bactericida <i>in vivo</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	25
Coeficientes de dilución (η) del yodóforo.....	28
Discusiones.....	29
Conclusiones	32
Bibliografía	33
ANEXOS	35

Resumen

El presente trabajo estableció los parámetros para el manejo del yodóforo como desinfectante. Se evaluó la eficacia bactericida del desinfectante a distintas concentraciones y 3 tiempos de acción: 1, 5 y 10 min de contacto sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 de recuento inicial $10^6 \frac{ufc}{ml}$ *in vitro* y $10^6 \frac{ufc}{100cm^2}$ *in vivo* en una lámina de acero inoxidable AISI 316L.

Los resultados revelaron una efectividad bactericida superior sobre cepas de *E. coli* obteniéndose una efectividad del 99,999% con una concentración de desinfectante de 15 ppm y tiempo de contacto de 1 min *in vitro*, mientras que con 100 ppm y 1 min de contacto se logró el mismo resultado sobre la lámina de acero inoxidable. *S. aureus* mostró mayor resistencia ante el yodóforo siendo necesario para una efectividad del 99,999% una concentración de desinfectante de 15 ppm durante 5 min de acción *in vitro* y 400 ppm durante 1 min de acción sobre la superficie de acero inoxidable. Para ambas cepas la velocidad específica de muerte k aumentó proporcionalmente con la concentración de desinfectante y disminuyó con el tiempo de contacto, teniendo un cambio drástico después del primer minuto de contacto, en el cual se alcanzó valores máximos, obteniéndose para los ensayos en *E. coli* un valor de $13s^{-1}$ para la concentración de 15 ppm en el ensayo *in vitro* y $12s^{-1}$ con 100 ppm en la lámina de acero inoxidable. Mientras que para *S. aureus* se obtuvo $12,8s^{-1}$ con 20 ppm *in vitro* y $12s^{-1}$ con 400 ppm en la lámina de acero inoxidable. Los coeficientes de dilución *in vitro* fueron 5,7 para *E. coli* y 5,6 para *S. aureus*, mientras que *in vivo* fueron 3,3 para *E. coli* y 8,0 para *S. aureus*.

Los resultados sugieren que existe una relación entre la naturaleza de las cepas y la adherencia a la superficie de acero inoxidable puesto que el análisis estadístico demostró diferencias significativas en las reducciones decimales de las pruebas realizadas *in vitro* y las pruebas realizadas *in vivo*.

Summary

The present study established the parameters for the iodophor as a disinfectant. The disinfectant bactericidal effectiveness it was assessed at different concentrations and 3 times: 1, 5 and 10 min of contact on strains *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 by initial count $10^6 \frac{ufc}{ml}$ *in vitro* and $10^6 \frac{ufc}{100cm^2}$ *in vivo* on a stainless steel surface AISI 316L.

The results reveal a bactericidal effectiveness higher on *E. coli* strains, obtaining an effectiveness of 99,999% with a disinfectant concentration of 15 ppm and an action time of 1 min *in vitro*, whereas with 100 ppm and 1 min of action time, it was achieved the same result on the stainless steel surface. *S. aureus* cells showed higher resistance to iodophor being necessary for an effectiveness of 99,999% a disinfectant concentration of 15 ppm during 5 min of action *in vitro* and 400 ppm during 1 min of action on the stainless steel surface. For both strains, the specific speed of death increased proportionally with the disinfectant concentration and decreased with contact time, having a drastic change after the first minute of contact, in which, it was reached maxim values, obtaining for the assay *in vitro* and $12s^{-1}$ for 100 ppm on the stainless steel surface. Whereas for *S.aureus* it was obtained $12,8s^{-1}$ with 20 ppm *in vitro* and $12s^{-1}$ with 400 ppm on the stainless steel surface. The dissolution coefficient *in vitro*, it was 5, 7 for *E.coli* and 5, 6 for *S.aureus*, Whereas *in vitro* it was 3, 3 for *E.coli* y 8, 0 for *S.aureus*.

The result suggest that exist a relation between the nature of the strains and the adherence at the stainless steel surface due to the statistical analysis demonstrated significant differences in decimal reduction for the test realized *in vitro* and the test realized *in vivo*.

Introducción

En la industria alimentaria la desinfección es el proceso químico usado para eliminar o disminuir la carga microbiana que puede quedar en el equipo después del proceso de limpieza. Una desinfección no adecuada puede ocasionar que la presencia de algunos microorganismos pueda llegar a afectar al consumidor provocando enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Éstas son ocasionadas por la ingesta de alimentos o bebidas contaminadas con gérmenes patógenos, o con productos químicos nocivos.

Existen numerosos microorganismos patógenos que pueden contaminar los alimentos, ocasionando cuadros clínicos diferentes según el agente involucrado. En Chile los principales agentes involucrados en brotes de ETAs han sido: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Cronobacter sakazakii*, *Campylobacter jejuni* y *E. coli* enterohemorrágica (ISP, 2009). Se han descrito más de 250 enfermedades diferentes transmitidas por los alimentos, la mayoría de las cuales son infecciones ocasionadas por bacterias, virus y parásitos (Moreno, 2010).

Para asegurar que a nivel de la industria de alimentos se logre eliminar o reducir a niveles aceptables la contaminación microbiológica, es que el uso de productos desinfectantes es de suma importancia.

El yodo ha demostrado ser un excelente agente germicida. Sin embargo, su acción corrosiva unida a su escasa solubilidad, su fuerte olor, y su tendencia a teñir las superficies sobre las que se aplica, lo hacen inutilizable en las industrias agroalimentarias. No obstante, cuando el yodo se une a un agente con actividad de superficie no iónica, que actúa como disolvente y portador del yodo, formando los conocidos como yodóforos, estos inconvenientes quedan neutralizados. Su espectro de acción abarca a las bacterias Gram positivas y a las Gram negativas, a los mohos, a las levaduras y a los virus. Sin embargo, son poco activos frente a esporas bacterianas, se suelen utilizar a concentraciones de 10 a 100 ppm con temperaturas de hasta 50°C (Pérez, 2014).

Un yodóforo es un complejo de yodo con un portador que tiene al menos tres funciones: (a) incrementar la solubilidad del yodo, (b) proporcionar un depósito de liberación sostenida del halógeno, y (c) reducir la concentración de equilibrio de yodo molecular libre. Los portadores son polímeros neutros como, por ejemplo: Polivinilpirrolidona, Nonilfenoxi-polietoxietanol, Polietilenglicol, Alcohol polivinílico, Polisacáridos, entre otros.

La solubilidad de los yodóforos en agua es buena, pero depende de la longitud de la cadena de moléculas poliméricas. El yodóforo más conocido es la povidona yodada, un compuesto de polímero 1-vinil-2-pirrolidona con yodo, que contiene no menos de 9% y no más de 12% de yodo disponible y su solubilidad varía entre el 5% y el 20%. (Schenck et al; 1979)

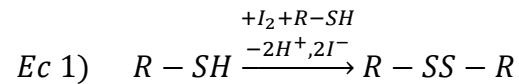
En un yodóforo el verdadero agente bactericida es el yodo molecular libre, porque es sólo esta especie en la que se ha demostrado una correlación entre la concentración y la actividad bactericida, y no así para la concentración total de yodo (suma entre el yodo molecular libre y el yodo acomplejado) o la concentración del yodóforo (que contempla la cadena portadora).

Se debe considerar que las diversas preparaciones comerciales difieren en la cantidad y el tipo de aditivos tales como, detergentes y agentes de relleno, los cuales generalmente tienen propiedades acomplejantes del yodo. Esto da como resultado una diferencia significativa en la concentración de yodo molecular libre, a pesar del hecho que la concentración real del yodóforo o la concentración de yodo total titulable podría ser la misma.

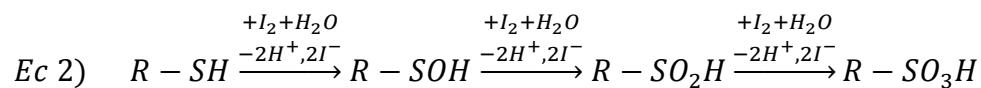
El yodo, principalmente en su forma molecular, puede penetrar la pared de los microorganismos rápidamente, lo que se puede considerar como su característica fundamental. Aunque los detalles exactos de cómo el yodo molecular mata las células vivas no es bien sabido, es plausible que la muerte microbiana se deba a que el yodo, al ser un halógeno tiene un efecto oxidante que provoca la inactivación de proteínas enzimáticas al convertir los radicales tioles ($-SH$) de la cisteína en disulfuros ($-S-S-$). Además, atacan radicales aminos, el grupo indol del triptófano y

la tirosina. Aparte de su poder oxidante, se combina irreversiblemente con los residuos de tirosina de las proteínas.

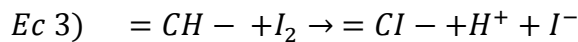
A continuación, se muestra las reacciones más probables que conllevan a la muerte celular.



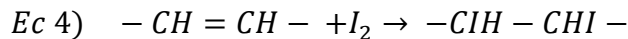
Oxidación de grupos tioles generando disulfuros



Oxidación de grupos tioles generando Oxoácidos



Substitución de compuestos aromáticos activados (e.g., tirosina, histidina, citosina y uracilo)



Adición de I₂ a alquenos de ácidos grasos insaturados

Los efectos provocados por las reacciones de las ecuaciones 1) a la 4) pueden tener las siguientes consecuencias:

- 1) La oxidación del grupo tiol del aminoácido cisteína resulta en la pérdida de la habilidad de conectar proteínas por puentes disulfuro, el cual es un factor importante en la síntesis de proteínas.
- 2) La yodación de los grupos fenólico e imidazol de la tirosina e histidina respectivamente, que forman rápidamente derivados de monoyodos y diyodos, además la yodación de los derivados de pirimidina citosina y uracilo podrían aumentar la densidad de las moléculas, llevándolas a una forma que obstaculice estéricamente los puentes de hidrógeno causando denaturación en el ADN y ARN.

- 3) La adición de yodo a ácidos grasos insaturados podría generar un cambio físico en las propiedades de los lípidos y causar inmovilización en la membrana. Además, se cree que el yodo podría interactuar con los dobles enlaces de los fosfolípidos causando daño a la pared celular y provocando así la pérdida de material intracelular.

De los puntos expuestos anteriormente el primero podría ser el más importante debido a la presencia ubicua de los grupos tiol y a la gran velocidad e irreversibilidad de la reacción con el yodo (Block, 2001).

En el presente estudio se realizaron ensayos para determinar la efectividad de la acción desinfectante del yodóforo en función de su concentración y tiempo de aplicación, *in vitro* y sobre una superficie de acero inoxidable, emulando equipos de la industria alimentaria, frente a dos cultivos de cepas bacterianas, una Gram+ (*S. aureus*) y otra Gram- (*E. coli*).

Hipótesis

El yodóforo tiene actividad bactericida, eliminando o disminuyendo la carga bacteriana presente en superficies de acero inoxidable.

Objetivo General

Comprobar el efecto bactericida *in vivo* del yodóforo en una superficie de acero inoxidable.

Objetivos específicos

- Determinar *in vitro* el tiempo y concentración bactericida óptimo del yodóforo frente a cepas de *S. aureus* y *E. coli*.
- Confirmar con ensayos *in vivo* el tiempo y concentración bactericida óptimo determinado *in vitro*, frente a las cepas bacterianas.
- Cuantificar la eficacia germicida (E) del desinfectante en la superficie de acero inoxidable, a las concentraciones y tiempos seleccionados.
- Determinar para cada microorganismo la velocidad específica de muerte (k), tiempo de reducción decimal (TRD) y el coeficiente de dilución del desinfectante (η).

Materiales y Métodos

Insumos

- Lámina de acero inoxidable AISI 316L sanitario
 - Espesor: 1-2 mm
 - Densidad: 7,96 g/cm³
- Yodóforo (Solución de povidona yodada de 10.000ppm)
- Cepa de *S. aureus* ATCC 29213
- Cepa de *E. coli* ATCC 25922
- Caldo Tripticasa de Soya (TSB)
- Agar Tripticasa de Soya (TSA)
- Neutralizante Na₂S₂O₃(0,1N)

Equipos

- Autoclave
- Agitador vórtex
- Microondas
- Baño termostático
- Incubadora 37±1°C

Metodología

Estandarización y recuento de las cepas:

Según especificaciones de la ICMSF (1978) se traspasó 1 ml de cada cultivo bacteriano a 9 ml de Caldo Trypticase de Soya incubando a 37°C por 24 h. Esta operación se repitió por 3 d consecutivos para estandarizar los cultivos.

El recuento se realizó sembrando diferentes diluciones decimales de cada cepa estandarizar en placas de Agar Trypticase de Soya incubándolas a 37°C por 24 h. La determinación se realizó en triplicado para cada caso. El procedimiento se repitió cada vez que se realizó un nuevo experimento.

Control del neutralizante:

Para comprobar que el neutralizante no tuviera acción bactericida se mezclaron 9 ml de neutralizante 0,1N con 1 ml de cepa a la concentración de 10^6 ufc/ml obteniéndose dos tubos con 10 ml, uno de cada cepa, y se realizó un recuento en placa por triplicado de las diluciones correspondientes. Si el neutralizante no tiene acción bactericida a esa concentración, el recuento obtenido debería ser muy similar al recuento del inóculo inicial. Por otro lado, para verificar la efectividad del neutralizante frente al desinfectante se empleó la metodología recomendada por Russell (1998). Se mezcló 1 ml de neutralizante con 8 ml de desinfectante para cada concentración utilizada. Posteriormente se inoculó con 1 ml de cepa a la concentración 10^6 ufc/ml (para cada cepa) y se realizó un recuento en placa por triplicado de las diluciones correspondientes. Sí el neutralizante detiene la acción del desinfectante el recuento obtenido debería ser muy similar al recuento del inóculo inicial.

Determinación *in vitro* de la actividad bactericida óptima:

La metodología utilizada es la recomendada por la AOAC (1984). Se prepararon frascos de 99 ml de solución del desinfectante a distintas concentraciones. Se inoculó 1 ml de microorganismo (cada microorganismo en distintos frascos) de forma que la concentración en los frascos fuera de 10^6 ufc/ml y se dejó actuar el desinfectante a 3 tiempos diferentes (1,5 y 10 min). Transcurridos estos tiempos se tomó una alícuota de 1 ml que se depositó en tubos de ensayo con 9 ml del neutralizante, y luego se realizaron 3 diluciones decimales que se utilizaron para hacer el recuento en placa de agar. Con estos valores se estableció que concentración de desinfectante y a qué tiempo de acción son los óptimos para cada microorganismo.

Evaluación *in vivo* sobre una superficie de acero inoxidable, de los resultados obtenidos *in vitro*:

Para estos ensayos se utilizó una lámina de superficie rectangular de acero inoxidable que se dividió a lo largo en 2 filas, las cuales se fraccionaron cada cual en 4 superficies rectangulares con un área correspondiente a 100cm^2 cada una, de este modo los recuentos en las superficies rectangulares se expresaron en ufc/ 100cm^2 . Primero se estandarizó el recuento de ambas cepas en el área de 100 cm^2 , de tal forma de obtener un recuento de 10^6 ufc/ 100cm^2 . Para cada ensayo se utilizó la primera superficie rectangular para el recuento inicial, inoculando 1 ml de cepa el cual debía corresponder a un recuento de 10^6 ufc/ 100cm^2 para que los siguientes resultados se consideraran como válidos. En la segunda, tercera y cuarta superficie rectangular se establecieron los tiempos de contacto correspondiendo a 1, 5 y 10 min respectivamente. Cada ensayo se realizó con un duplicado desarrollado en la segunda fila.

La toma de muestra desde la superficie se realizó mediante el método del hisopo o tórula (ISO 17604:2009), el cual consiste en una vez inoculada el área de la lámina se impregna por aspersion (lo que equivale empíricamente a 5 g de solución desinfectante) con el desinfectante a las concentraciones óptimas determinadas en los ensayos *in vitro*, y se toman las muestras de las áreas rectangulares correspondientes a los tiempos de contacto, primero con una tórula la cual se deposita en un tubo con 9 ml de neutralizante y posteriormente sobre la misma superficie se frota una segunda tórula seca, a fin de remover el posible residuo de contaminación que hubiera quedado después de pasar la primera tórula. Esta nueva tórula se deposita en el mismo tubo con neutralizante usado para la primera tórula.

Se efectúan los recuentos para determinar el número de sobrevivientes del mismo modo que en la determinación *in vitro*. Las determinaciones duplicadas se efectúan para cada concentración de desinfectante y en triplicado.

Cálculos:

Eficacia germicida porcentual (%E):

La eficacia germicida porcentual (%E) se evaluó de acuerdo a la fórmula:

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

Donde:

N_0 : Número de microorganismos iniciales

N_t : Número de microorganismos sobrevivientes a tiempo t

Velocidad específica de muerte (min^{-1}):

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

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

Donde:

N_0 : Número de microorganismos iniciales

N_t : Número de microorganismos sobrevivientes a tiempo t

k : Velocidad específica de muerte (t^{-1})

t : Tiempo de contacto entre el desinfectante y el microorganismo

Tiempo de reducción decimal (min):

El tiempo de reducción decimal (TRD) indica el tiempo transcurrido para reducir el recuento total en una potencia decimal, es decir, para destruir el 90% de las células. Se determinó de acuerdo a la fórmula:

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

Donde:

k: Velocidad específica de muerte

Coefficiente de dilución:

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

$$C^\eta * t = cte$$

Donde:

C: concentración del desinfectante

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

η : coeficiente de dilución

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

$$\eta = \frac{(\log t_2 - \log t_1)}{(\log C_1 - \log C_2)}$$

Donde:

t: tiempo necesario para la destrucción de todos los microorganismos.

C: concentración del desinfectante.

Análisis estadístico:

El análisis estadístico contempló un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) con $\alpha=0,05$ y prueba de múltiples rangos de Duncan. El primer análisis estadístico toma los factores concentración de desinfectante y tiempo de contacto o acción del desinfectante y los compara con las medias de la variable de respuesta que corresponde a la reducción logarítmica promedio expresada en (log ufc/ml) para los ensayos *in vitro*, y (log ufc/100cm²) para los ensayos *in vivo*, y de este modo establecer la existencia o no de diferencias significativas. El segundo análisis utiliza los factores en los cuales se encuentran las diferencias significativas y lo compara para establecer que datos arrojan significancia dentro del mismo factor.

Resultados

Estandarización y control de neutralizante

Tabla 1: Estandarización y control de neutralizante.

Estandarización	N°Inicial (ufc/ml)	
<i>E. coli</i>	2,4±0,1 E+09	
<i>S. aureus</i>	4,5±0,1 E+08	
Control Neutralizante		N°(ufc/ml)
<i>E. coli</i>	Neu+C	2,9±0,1 E+06
	Y+Neu+C	3,4±0,1 E+06
<i>S. aureus</i>	Neu+C	2,8±0,1 E+06
	Y+Neu+C	3,7±0,1 E+06

Neu: neutralizante 0,1N; C:cepa; Y:yodóforo 1%

En la tabla 1 se observan los promedios de los resultados obtenidos para la estandarización de las cepas y control de neutralizante, estos fueron realizados cada uno en triplicado. Se observa que los valores de estandarización denotan una mayor velocidad de crecimiento por parte de *E. coli*, alcanzando esta una concentración 10 veces mayor que *S. aureus* en el caldo de cultivo. Por otra parte, los controles realizados al neutralizante demostraron de este no tener efecto alguno sobre el desarrollo de ninguna de las dos cepas bacterianas analizadas.

Acción bactericida *in vitro* sobre *Escherichia coli*

Las concentraciones elegidas en primera instancia fueron tomando como referencia el límite de enjuague del yodóforo, el cual corresponde a 25 ppm, sin embargo, esta concentración resultó demasiado alta y luego de los primeros ensayos se modificó para encontrar la concentración que llevara a una eficacia bactericida del 99,999%. Siendo entonces las concentraciones de desinfectante utilizadas para *E.coli* 5, 10 y 15 ppm. Se observó que a partir de 10 ppm de producto se obtienen recuentos en placas libres de colonias después de 10 min de contacto. La concentración más eficaz fue 15 ppm, seguida de 10 ppm y finalmente 5 ppm como puede apreciarse en la figura 1.

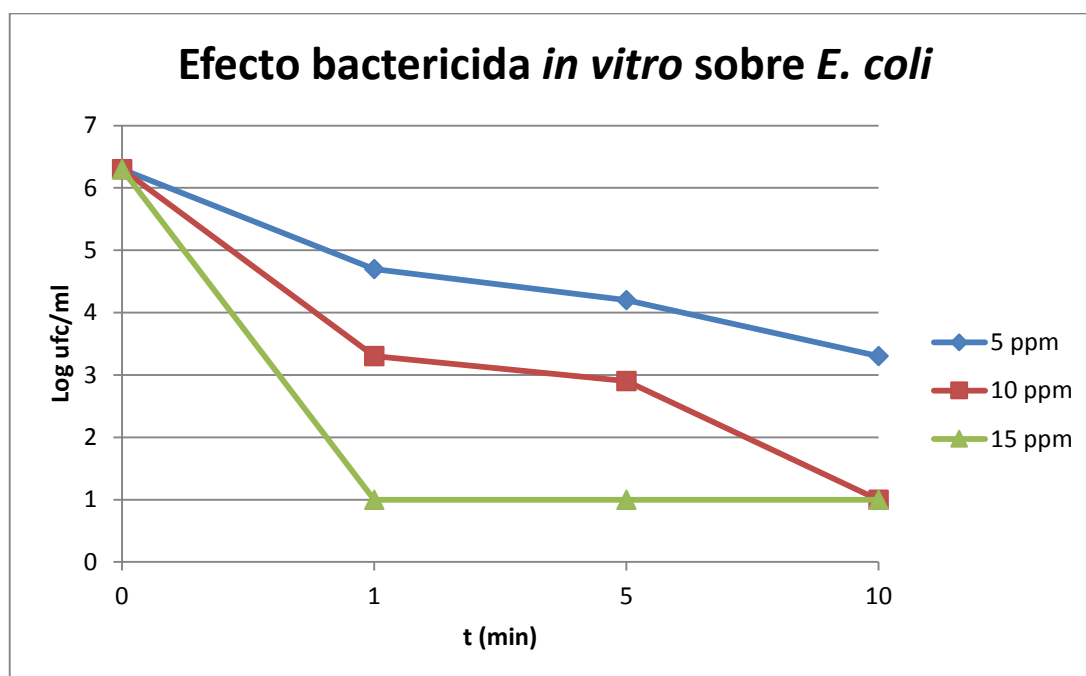


Figura 1: efecto *in vitro* del yodóforo a distintas concentraciones sobre *E. coli*.

En el caso de la concentración de 5 ppm se produjo una reducción de hasta 3 ciclos logarítmicos, para la concentración de 10 ppm y 15 ppm se logró reducción de hasta 5 ciclos logarítmicos. En relación con el tiempo de acción se observa que durante el primer minuto se produce la mayor acción desinfectante.

Tabla 2: Actividad bactericida *in vitro* del yodóforo a distintas concentraciones frente a *E. coli*.

Concentración (ppm)	p-value	Tiempo (min)	p-value	n° (ufc/ml)	Log (ufc/ml)	Reducción (log ufc/ml)	%E	k (min-1)	TRD (min)
5 ^a	0,0109	0	0,1494	2,7±0,1 E+06	6,4	-	-	-	-
		1		7,3±0,1 E+04	4,9	1,5	97,296	3,61	0,64
		5		2,2±0,1 E+04	4,3	2,1	99,185	0,96	2,39
		10		2,8±0,2 E+03	3,4	3	99,896	0,69	3,35
10 ^b		0		2,7±0,1 E+06	6,4	-	-	-	-
		1		3,2±0,1 E+03	3,5	2,9	99,881	6,74	0,34
		5		9,2±0,1 E+02	3	3,4	99,966	1,6	1,44
		10		<10	1	5,4	99,999	1,25	1,84
15 ^b		0		2,7±0,1 E+06	6,4	-	-	-	-
		1		<10	1	5,4	99,999	12,51	0,18
		5		<10	1	5,4	99,999	2,5	0,92
		10		<10	1	5,4	99,999	1,25	1,84

Superíndices distintos indican diferencias significativas.

El 99,999% de reducción se logró con 10ppm de desinfectante después de 10 min de contacto entre el desinfectante y el microorganismo, y con 15 ppm después de 1 min de contacto.

También se puede observar que a medida que transcurre el tiempo de contacto disminuye la velocidad específica de muerte y por consiguiente aumenta el tiempo de reducción decimal. Se aprecia que k , para todas las concentraciones tiene su máximo durante del primer minuto de contacto, cayendo en forma abrupta posteriormente.

El análisis ANOVA multifactorial desarrollado para la variable dependiente “Reducción decimal (log ufc/ml)” teniendo como factores a “concentración de desinfectante (ppm)” y “tiempo de contacto (min)” encontró que con una confianza del 95% existen diferencias significativas en la reducción decimal al producirse variación en las concentraciones de desinfectante utilizadas (factor “concentración de desinfectante”), mientras que en el trascurso del tiempo denotado por el factor “tiempo de contacto” no se observaron diferencias significativas. Dadas las diferencias halladas para “concentración de desinfectante” se realizó una prueba de múltiples rangos para determinar que concentraciones eran las que mostraban diferencias en sus medias. Obteniéndose que las diferencias significativas radicaban entre 5 ppm versus 10 ppm y 5 ppm versus 15 ppm. Esto se ve reflejado en la columna de concentración de la tabla 1 donde los superíndices iguales indican que no existen diferencias significativas y superíndices distintos indican que si las hay.

Acción bactericida *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus*

De igual forma que para *E.coli*, las concentraciones elegidas primeramente fueron demasiado altas por lo que se cambiaron en función de encontrar la concentración que llevara a una eficacia bactericida del 99,999%. Siendo entonces las concentraciones de elegidas para *S. aureus* 10, 15 y 20 ppm.

En la figura 2 se observa como la concentración del yodóforo más eficaz fue 20 ppm, seguido de 15 ppm y finalmente 10 ppm.

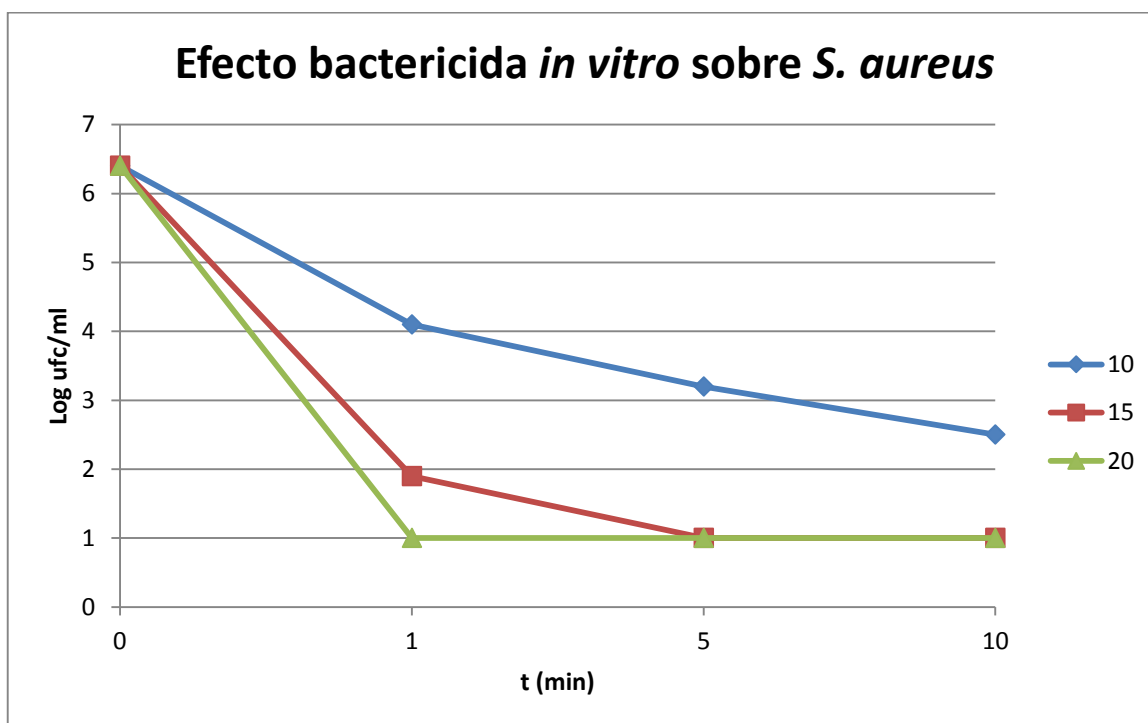


Figura 2: efecto *in vitro* del yodóforo a distintas concentraciones sobre *S. aureus*.

El desinfectante logró reducir 4 ciclos logarítmicos con una concentración de 10ppm, y 5 ciclos logarítmicos con concentraciones de 15 y 20 ppm, sin embargo, como se aprecia en la tabla 3, sólo el ensayo de la concentración de 20 ppm logró el 99,999% de efectividad bactericida durante el primer minuto de contacto, mientras que para el ensayo de la concentración de 15 ppm tuvieron que transcurrir 5 minutos para obtener el mismo resultado. Nuevamente se observa la marcada diferencia de acción bactericida en el primer minuto de contacto teniendo especial énfasis a mayores concentraciones.

Tabla 3: Actividad bactericida *in vitro* del yodóforo a distintas concentraciones frente a *S. aureus*.

Concentración (ppm)	p-value	Tiempo (min)	p-value	n° (ufc/ml)	Log (ufc/ml)	Reducción (log ufc/ml)	%E	k (min-1)	TRD (min)
10 ^a	0,003	0	0,1432	3,5±0,1 E+06	6,5	-	-	-	-
		1		1,2±0,1 E+04	4,1	2,4	99,657	5,68	0,41
		5		2,4±0,2 E+03	3,3	3,2	99,931	1,46	1,58
		10		4,8±0,2 E+02	2,7	3,8	99,986	0,89	2,59
15 ^b		0		3,5±0,1 E+06	6,5	-	-	-	-
		1		8,7±0,1 E+01	1,9	4,6	99,998	10,6	0,22
		5		<10	1	5,5	99,999	2,55	0,9
		10		<10	1	5,5	99,999	1,28	1,8
20 ^b		0		3,5±0,1 E+06	6,5	-	-	-	-
		1		<10	1	5,5	99,999	12,77	0,18
		5		<10	1	5,5	99,999	2,55	0,9
		10		<10	1	5,5	99,999	1,28	1,8

Superíndices distintos indican diferencias significativas.

En comparación al comportamiento frente a *E. coli* el *S. aureus* mostró mayor resistencia la cual queda evidenciada principalmente en los valores obtenidos del ensayo con 10 ppm de desinfectante, donde *E. coli* incluso alcanza el 99,999% de efectividad bactericida a los 10 min de contacto mientras que *S. aureus* sólo el 99,99%.

Por otro lado, se produce un descenso de la velocidad específica de muerte e incremento del tiempo de reducción decimal al igual que ocurre con *E. coli*, siendo la reducción de k menos marcada en la concentración de 10 ppm. Esto demuestra la limitación del desinfectante a altas diluciones para lograr la interacción con el microorganismo. También se observa que la variación entre los tiempos de reducción decimal a las distintas concentraciones es leve tanto en *E. coli* como *S. aureus*, lo que demuestra una resistencia por parte del microorganismo frente al desinfectante.

Con una confianza del 95% el análisis estadístico denotó diferencias significativas en las reducciones decimales al variar el factor concentración. La prueba de múltiples rangos determinó la significancia entre las concentraciones de 10 ppm versus 15 y 10 ppm versus 20 ppm, las cuales pueden apreciarse tanto en los superíndices de la tabla 3 como al observar el comportamiento cinético en la figura 2. Por otro lado, para el factor tiempo de contacto no se observaron diferencias significativas.

Acción bactericida *in vivo* sobre *Escherichia coli*

Se utilizaron las concentraciones de la determinación *in vitro*, pero todos los valores obtenidos de los recuentos fueron excepcionalmente altos por lo que se adoptaron nuevas concentraciones de forma tal que pudiera obtenerse un valor óptimo que satisfaga el 99,999% de efectividad bactericida, siendo las concentraciones utilizadas sobre *E. coli* 25, 50 y 100 ppm.

Se aprecia en la figura 3 que la concentración óptima bactericida sólo se alcanza con 100 ppm independiente del tiempo. Mientras que las concentraciones 25 y 50 ppm mostraron una cinética similar.

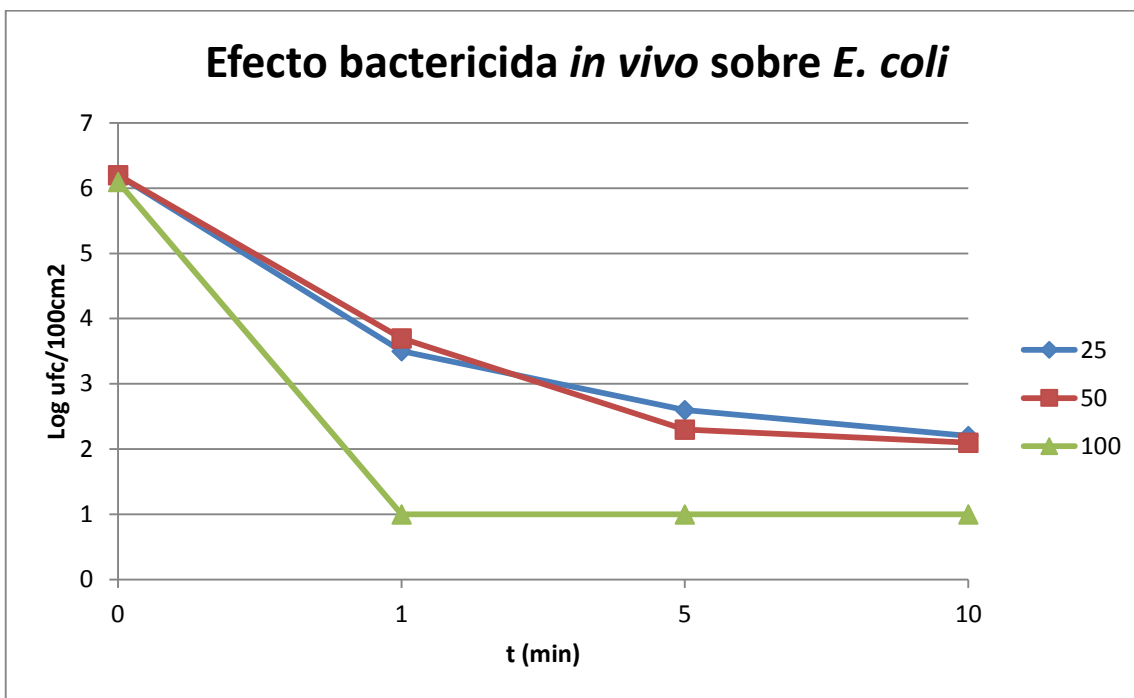


Figura 3: efecto *in vivo* del yodóforo a distintas concentraciones sobre *E. coli*.

La aplicación del yodóforo a 100 ppm logró una reducción de 5 ciclos logarítmicos en 1 min, la cual se mantuvo constante hasta los 10 min. Para las concentraciones de 25 y 50 ppm del desinfectante la reducción en el primer minuto alcanzó 2 ciclos, seguidos de 3 ciclos a los 5 min y un máximo de 4 ciclos logarítmicos a los 10 min de contacto.

Tabla 4: Actividad bactericida *in vivo* del yodóforo a distintas concentraciones frente a *E. coli*.

Concentración (ppm)	p-value	Tiempo (min)	p-value	n° (UFC/100cm2)	Log (ufc/100cm2)	Reducción (log ufc/100cm2)	%E	k (min-1)	TRD (min)
25 ^a	0,0133	0	0,1163	1,6±0,1 E+06	6,2	-	-	-	-
		1		4,7±0,1 E+03	3,7	2,5	99,706	5,83	0,39
		5		6,2±0,1 E+02	2,7	3,5	99,961	1,57	1,46
		10		1,8±0,1 E+02	2,3	3,9	99,989	0,91	2,53
50 ^a		0		1,6±0,1 E+06	6,2	-	-	-	-
		1		6,5±0,1 E+03	3,8	2,4	99,594	5,51	0,42
		5		3,3±0,1 E+02	2,5	3,7	99,979	1,7	1,36
		10		1,2±0,2 E+02	2,1	4,1	99,993	0,95	2,42
100 ^b		0		1,6±0,1 E+06	6,2	-	-	-	-
		1		<10	1	5,2	99,999	11,98	0,19
		5		<10	1	5,2	99,999	2,4	0,96
		10		<10	1	5,2	99,999	1,2	1,92

Superíndices distintos indican diferencias significativas.

La eficacia germicida obtuvo su valor máximo en la concentración de 100 ppm de desinfectante correspondiendo a un 99,999% a partir del primer minuto de contacto y manteniéndose hasta los 10 min.

En este caso se observa que la similitud entre el comportamiento frente a 25 y 50 ppm de desinfectante se muestran valores de k muy similares entre ellos pero que se distancian significativamente de los valores obtenidos con 100 ppm de desinfectante. k obtiene su máximo el primer minuto con la aplicación de todas las concentraciones de desinfectante.

El ANOVA encontró con un 95% de confianza que existen diferencias significativas en las reducciones decimales al variar en el factor “concentración de desinfectante” y no así en la influencia del tiempo de contacto. La prueba de múltiples rangos determinó que la significancia radica únicamente en la concentración de 100 ppm, esto puede verse reflejado en el comportamiento cinético ilustrado en la figura 3 donde se aprecia la similitud mencionada anteriormente entre 25 y 50 ppm.

Acción bactericida *in vivo* sobre *Staphylococcus aureus*

Se utilizaron las concentraciones de la determinación *in vitro*, pero al igual que para *E. coli* los valores obtenidos de los recuentos fueron muy altos, por lo que se buscaron nuevas concentraciones, sin embargo, *Staphylococcus aureus* mostró una marcada resistencia ante el yodóforo, llevando el experimento a incrementar enormemente la concentración de desinfectante a fin de encontrar una concentración óptima bactericida que satisfaga el 99,999%. Se estudiaron concentraciones de 200, 300 y 400 ppm del yodóforo siendo la última (400 ppm) la que presentó una efectividad notablemente mayor, siguiéndole 300 ppm y 200 ppm respectivamente.

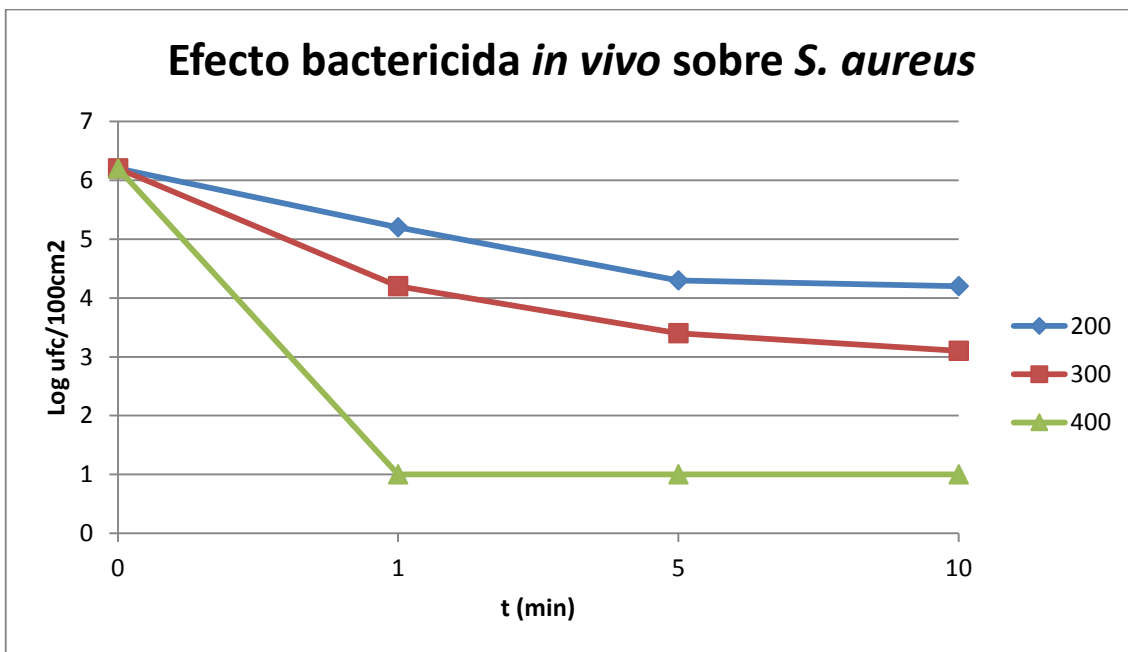


Figura 4: efecto *in vivo* del yodóforo a distintas concentraciones sobre *S. aureus*.

En la figura 4 se observa una gran diferencia de la acción del desinfectante a 100 pm en relación con las demás concentraciones, siendo esta la única que logra alcanzar una reducción de 5 ciclos logarítmicos y desde el primer minuto de contacto. El desinfectante a 200 ppm obtiene una reducción de 2 ciclos a los 5 min y no alcanza los 3 ciclos a los 10 min, por otro lado, el desinfectante de 300 ppm logra una reducción de 2 ciclos el primer minuto y logra llegar hasta 3 ciclos a los 10 min.

Tabla 5: Actividad bactericida *in vivo* del yodóforo a distintas concentraciones frente a *S. aureus*.

Concentración (ppm)	p-value	Tiempo (min)	p-value	N° (UFC/100cm ²)	Log (ufc/100cm ²)	Reducción (log ufc/100cm ²)	%E	k (min ⁻¹)	TRD (min)
200 ^a	0,0004	0	0,1376	1,7±0,1 E+06	6,2	-	-	-	-
		1		2,3±0,1 E+05	5,4	0,8	86,471	2	1,15
		5		2,5±0,1 E+04	4,4	1,8	98,529	0,84	2,73
		10		1,8±0,1 E+04	4,3	1,9	98,941	0,45	5,06
300 ^b		0		1,7±0,1 E+06	6,2	-	-	-	-
		1		1,4±0,1 E+04	4,1	2,1	99,176	4,8	0,48
		5		4,3±0,1 E+03	3,6	2,6	99,747	1,2	1,92
		10		1,2±0,1 E+03	3,1	3,1	99,929	0,73	3,17
400 ^c		0		1,7±0,1 E+06	6,2	-	-	-	-
		1		<10	1	5,2	99,999	12,04	0,19
		5		<10	1	5,2	99,999	2,41	0,95
		10		<10	1	5,2	99,999	1,2	1,91

Superíndices distintos indican diferencias significativas.

De acuerdo con la tabla 5 la eficacia germicida óptima se alcanzó con el desinfectante a 400 ppm desde el primer minuto de contacto y manteniéndose hasta los 10 min de estudio. Como en el resto de los ensayos el valor k alcanza un máximo que coincide con el primer minuto de contacto del desinfectante y luego se reduce drásticamente. La velocidad específica de muerte es mayor a medida que aumenta la concentración.

El análisis estadístico reveló que con un 95% de confianza hubo diferencias significativas en las reducciones decimales al variar en el factor concentración, mientras que no las hubo en con la variación del factor tiempo de contacto. La significancia se vio reflejada en la variación de cada concentración tomada, muy probablemente debido a que en este ensayo las variaciones entre las concentraciones elegidas fueron más grande que en el resto de los ensayos.

Coefficientes de dilución (η) del yodóforo

Hay que tener en cuenta que, la disminución de la concentración de un agente desinfectante no implica un aumento estrictamente proporcional con el tiempo de acción para obtener el mismo resultado, ya que el tiempo depende del coeficiente de dilución el cual es una constante para cada producto.

Un coeficiente de dilución igual a 1 indica que no hay diferencias entre la variación del tiempo de contacto y la concentración del desinfectante sobre la actividad bactericida del desinfectante. Cuando los valores del coeficiente son mayores que 1 la variación de la concentración del producto implica mayor variación del efecto bactericida, mientras que la variación del tiempo de contacto será menos significativa. Finalmente, si el coeficiente de dilución es menor que 1, es la variación de la concentración la que pierde importancia y pasa a ser más influyente el tiempo de contacto.

En la tabla 6 se observa que el coeficiente de dilución es similar entre *E. coli* y *S. aureus* en la experiencia *in vitro*, mientras que para la experiencia *in vivo* se manifiesta una gran diferencia.

Tabla 6: coeficiente de dilución del yodóforo sobre las cepas de estudio

Experiencia	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>in vitro</i>	5,7	5,6
<i>in vivo</i>	3,3	8,0

El coeficiente de dilución similar obtenido sobre *E. coli* y *S. aureus* demuestra que el desinfectante presenta la misma efectividad en los ensayos *in vitro* para ambos microorganismos, sin embargo, en los ensayos *in vivo* se aprecia una reducción del coeficiente de dilución para *E. coli* y un aumento para *S. aureus*.

Todos los valores obtenidos de coeficiente de dilución exceptuando 3,3 para *E. coli* son elevados, esto quiere decir que la dilución afecta significativamente la eficiencia de la desinfección.

Discusiones

En los ensayos *in vitro* se observó que para *E. coli* el mejor resultado (eficacia germicida del 99,999%) correspondió al obtenido con el desinfectante de 15 ppm puesto que, aunque con 10 ppm también se logra un 99,999% de eficacia, este ocurre sólo 10 minutos después de aplicado el desinfectante, lo cual puede considerarse un tiempo excesivo. Lo mismo ocurre con *S. aureus*, ya que con el desinfectante de concentración 15 ppm se alcanza el 99,999% de la eficacia en un tiempo de 5 min, el cual puede considerarse un tiempo razonable, sin embargo, con el aumento a 20 ppm el tiempo para alcanzar el mismo resultado se reduce a 1 min.

Se aprecia que los valores de k son proporcionales en relación con la concentración de yodo libre para los resultados *in vitro*. El hecho de que el TRD vaya aumentando a medida que transcurre el tiempo indica que la concentración de yodo va disminuyendo, es decir, la velocidad específica de muerte k es mayor cuando el desinfectante está más concentrado, y disminuye considerablemente en función del tiempo de contacto, en especial después del primer minuto. Lo que se aprecia tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo*. Esto se condice con los valores de TRD, que en todos los casos disminuye al aumentar la concentración de desinfectante, lo que indica que en general para el yodóforo a mayor concentración de desinfectante menor será el tiempo en conseguir la misma reducción.

Al comparar el efecto bactericida del yodóforo sobre ambas cepas bacterianas se aprecia una eficacia germicida superior sobre *Escherichia coli* siendo tanto *in vitro* como *in vivo* aquella cepa con la que se logra una eficacia bactericida del 99,999% con menor concentración de yodo libre, ya que la mínima concentración bactericida fue 10 ppm *in vitro* y 100 ppm *in vivo*, mientras que para *Staphylococcus aureus* fue de 15 ppm *in vitro* y 400 ppm *in vivo*. Este resultado es sorprendente ya que en relación a los desinfectantes según Bello (2011) en general se sobrepone la resistencia de bacterias Gram negativas a la de las Gram positivas argumentado por la protección que otorga la barrera de lipopolisacáridos de la membrana externa.

Sin embargo, de algún modo en este caso, para el yodóforo fue más relevante la resistencia del peptidoglicano de las bacterias Gram positivas que los lípidos de

membrana y lipopolisacáridos de la cepa Gram negativa, ya que de acuerdo con Mai-Prochnow (2016) estas diferencias entre la envoltura celular son las que confieren las diferentes propiedades a la célula, en particular las respuestas a estrés por factores externos, incluyendo calor, radiación UV, antibióticos y desinfectantes.

Según Cerra (2003) Para un coeficiente de dilución 1, una dilución a la mitad compensa con un aumento al doble del tiempo de contacto, para valores sobre 5 la dilución del medio aumenta tanto el tiempo necesario, que se considera una neutralización del agente por dilución. Altos valores de coeficientes de dilución indican que el proceso es relativamente sensible a los cambios de concentración de desinfectante.

En los ensayos *in vitro* se observó que los coeficientes de dilución eran muy similares, 5,7 y 5,6 para *E. coli* como para *S. aureus* respectivamente. Esto quiere decir que la forma en la que la concentración de desinfectante afecta a dichas cepas en función de la dilución es prácticamente la misma. Por otra parte, en los ensayos *in vivo* los coeficientes de dilución mostraron un descenso a 3,3 para *E. coli* y un aumento a 8,0 para *S. aureus*. Esta variación puede deberse a la interacción específica de las bacterias con la superficie de contacto. De acuerdo a McEldowney y Fletcher (1988) las bacterias tienden a unirse mejor a las superficies hidrófilas como el cristal, uniformemente en una capa, mientras que en las hidrófobas como el nylon y el acero inoxidable tienden a unirse en grupos. Estudios de Chik (2018) han reportado que sobre acero inoxidable *E. coli* posee menos adherencia debido a interacciones hidrófilas. En dicho estudio se demuestra que el grado de hidrofobicidad de *E.coli* varía entre 4,42% y 23,43%, lo que se considera hidrófilo, mientras que para *S. aureus* el valor es superior al 80%, lo que es hidrófobo. Es posible que esta sea la razón por la cual los experimentos *in vivo* revelaron tal resistencia de *S. aureus* ya que el acero inoxidable al ser una superficie hidrófoba tiende a retener a *S. aureus* y a repeler a *E. coli* debido a sus interacciones hidrófilas. Además, se debe considerar que a escala microscópica el acero presenta diminutas oquedades que no se ven macroscópicamente, lo cual permite una mayor retención de bacterias por el incremento del número de puntos de adhesión. Esta

característica de la superficie de proveer refugio a los microorganismos podría explicar la diferencia entre los resultados *in vitro* e *in vivo*, ya que, si se considera que el tiempo de acción más crítico en la aplicación del desinfectante es el primer minuto de contacto, puede que el ocultamiento de las bacterias en los espacios microscópicos que ofrece la lámina resulten en la supervivencia de las células a medida que el yodo libre comienza el proceso de dilución entre los restos de las células ya muertas.

Conclusiones

- Se determinó que la concentración bactericida óptima (99,999%) del yodóforo *in vitro* fue de 15 ppm de desinfectante frente a *E. coli* con un tiempo de acción de 1 min y 15 ppm de desinfectante frente a *S. aureus* con un tiempo de acción de 5min.
- La concentración bactericida óptima (99,999%) del yodóforo *in vivo* fue de 100 ppm de desinfectante frente a *E. coli* con un tiempo de acción de 1 min y 400 ppm de desinfectante frente a *S. aureus* con un tiempo de acción de 1 min.
- Para ambas cepas la velocidad específica de muerte k aumentó proporcionalmente con la concentración de desinfectante y disminuyó con el tiempo de contacto, teniendo un cambio drástico después del primer minuto de contacto, en el cual se alcanzó valores máximos, obteniéndose para los ensayos en *E. coli* un valor de $13s^{-1}$ para la concentración de 15 ppm en el ensayo *in vitro* y $12s^{-1}$ con 100 ppm en la lámina de acero inoxidable. Mientras que para *S. aureus* se obtuvo $12,8s^{-1}$ con 20 ppm *in vitro* y $12s^{-1}$ con 400 ppm en la lámina de acero inoxidable.
- Los coeficientes de dilución *in vitro* fueron 5,7 para *E. coli* y 5,6 para *S. aureus*, mientras que *in vivo* fueron 3,3 para *E. coli* y 8,0 para *S. aureus*.
- Dados los resultados obtenidos se puede concluir que el yodóforo evaluado cumple con el criterio de desinfectante de cepas de *E. coli* y *S. aureus*, y puede ser usado eficientemente sobre superficies de acero inoxidable.

Bibliografía

- AOAC. "Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists". 12th Ed. Washington. USA. 1984.
- ICMSF. "Microorganisms in Foods, their significance and methods of enumeration". 2da edición. Editorial Universidad de Toronto. Canada. 1978.
- ISO 17604:2009. Microbiology of food and animal feed - Carcass sampling for microbiological analysis.
- Moreno, M. Higiene alimentaria para la prevención de trastornos digestivos infecciosos y por toxinas. Revista Médica Clínica Las Condes. Santiago, Chile. 2010.
- Russell, A.D. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. Welsh School of Pharmacy, Cardiff University, Cardiff CF1 3XF Wales UK. 1998.
- Perez, E., Barrera, MC., Castelló, ML. Métodos para la desinfección en la industria alimentaria. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València. Valencia. 2014.
- Block, S. Disinfection, Sterilization and Preservation. Lippincott Williams & Wilkins. 5ta edición. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. 2001.
- McEldowney, S. y Fletcher, M. The effect of temperature and relative humidity on the survival of bacteria attached to dry solid surfaces. Letters in Applied Microbiology. 7(4):83-86. 1988.
- Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., Murphy, A. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. Scientific Reports. 6, 38610. 2016.
- Cerra,H., Fernández, MC., Horak, C., Lagomarsino, M., Torno, G., Zarankin, E. Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéuticas, cosméticas y de productos médicos. Asociación Argentina de Microbiología. 978-987-26716-3-1. 2013.
- Chik, N., Zain, S., Mohamad, A., Sidek, M. Bacterial Adhesion on the Titanium and Stainless-Steel surfaces Undergone two Different Treatment Methods:

Polishing and Ultrafast Laser Treatment. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 2018.

- Bello, A. introducción a la instrumentación quirúrgica. Zaragoza. Prensas Universitarias de Zaragoza. 2011.

ANEXOS

ANEXO 1: Resultados del análisis estadístico del ensayo sobre *E. coli in vitro*

Análisis de Varianza para Reducciones - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	15,38	2	7,69	17,15	0,0109
B:tiempo	2,84667	2	1,42333	3,17	0,1494
RESIDUOS	1,79333	4	0,448333		
TOTAL (CORREGIDO)	20,02	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para Reducciones por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
5	3	2,2	0,38658	x
10	3	3,9	0,38658	x
15	3	5,4	0,38658	x

ANEXO 2: Resultados del análisis estadístico del ensayo sobre *S. aureus in vitro*.

Análisis de Varianza para Reducción - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	9,96222	2	4,98111	34,48	0,0030
B:tiempo	0,948889	2	0,474444	3,28	0,1432
RESIDUOS	0,577778	4	0,144444		
TOTAL (CORREGIDO)	11,4889	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para Reducción por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
10	3	3,13333	0,219427	x
15	3	5,2	0,219427	x
20	3	5,5	0,219427	x

ANEXO 3: Resultados del análisis estadístico del ensayo sobre *E. coli in vivo*.

Análisis de Varianza para Reducción - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	6,86	2	3,43	15,36	0,0133
B:tiempo	1,72667	2	0,863333	3,87	0,1163
RESIDUOS	0,893333	4	0,223333		
TOTAL (CORREGIDO)	9,48	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para Reducción por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
25	3	3,3	0,272845	x
50	3	3,4	0,272845	x
100	3	5,2	0,272845	x

ANEXO 4: Resultados del análisis estadístico del ensayo sobre *S. aureus in vivo*.

Análisis de Varianza para Reducción - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	21,66	2	10,83	94,17	0,0004
B:tiempo	0,78	2	0,39	3,39	0,1376
RESIDUOS	0,46	4	0,115		
TOTAL (CORREGIDO)	22,9	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para Reducción por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
200	3	1,5	0,195789	x
300	3	2,6	0,195789	x
400	3	5,2	0,195789	x