



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

Eficiencia germicida y coeficiente de dilución del Ácido Hipocloroso in vitro frente a cepas bacterianas potencialmente frecuentes en la Industria Alimentaria

José Mario Romero Reyes

Patrocinante y Director

Químico (UCH)

Luis López Valladares

Director

Químico Farmacéutico (UCH)

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

Carolina Andrea Severino Almarza

Santiago, Chile

2023

Para mis ángeles en el cielo: mi
Abuelita, la mami, tío Víctor.

Para Mauricio, mi compañero de vida.

Para mis papás, Jéssica y Patricio.

Para mi hermano Andrés.

Agradecimientos

A mi compañero de vida, Mauricio, por ser mi pilar en todo el proceso académico. Por acompañarme, apoyarme y estar presente en cada momento. Por aguantar mis llantos y frustraciones, por estar en mis alegrías y éxitos. Tu amor me hace sentir que todo es posible si tenemos fe y calma en nuestro actuar. Con tu paciencia y calma aclaraste mis días nublados, trajiste a mí la claridad que me hacía falta para finalizar el proceso. Te amo y amaré siempre.

A mi familia maravillosa, mis padres Jéssica y Patricio y mi hermano Andrés, por apoyarme en cada paso que he dado en esta vida, por aguantarme en los momentos difíciles, por tenerme una paciencia increíble con este proceso y lo más importante, por el amor que me tienen, que ilumina mis días complejos.

A mis amigos Jéssami, Sebastián, Melissa, Alicia, Tamara, Fernando, Catalina, Mariam y Natalia, compañeros que se volvieron la mejor compañía en la universidad, sufrimos juntos, estuvimos en cada paso de los otros y seguimos siendo un grupo maravilloso. Gracias por siempre estar.

A la Universidad de Chile, a mis profesores, técnicos de laboratorio y ayudantes, quienes me proporcionaron los conocimientos y herramientas necesarias para enfrentarme a nuevos desafíos profesionales.

A todo aquel que haya ayudado en este proceso.

ÍNDICE

I.	Resumen.....	6
II.	Abstract	7
III.	Introducción	8
IV.	Hipótesis.....	16
V.	Objetivos	16
	V.I Objetivo General	16
	V.II Objetivos específicos.....	16
VI.	Materiales y Métodos	17
	VI.I Materiales	17
	VI.I.I Insumos.....	17
	VI.I.II Equipos.....	17
	VI.II Métodos.....	18
	VI.II.I Recuento inicial de las cepas	18
	VI.II.II Control del neutralizante	18
	VI.II.III Determinación de la actividad antimicrobiana del desinfectante.....	18
	VI.II.IV Análisis estadístico.....	22
VII.	Resultados	23
	VII.I Control del neutralizante	23
	VII.II Acción bactericida in vitro del desinfectante.....	24
	VII.II.I <i>Escherichia coli</i>	24
	VII.II.II <i>Listeria innocua</i>	27
VIII.	Discusión comparativa	30
	VIII.I Eficiencia germicida	30
	VIII.II Velocidad específica de muerte.....	31
	VIII.III Tiempo de reducción decimal.....	33
	VIII.IV Determinación del coeficiente de dilución (η)	34
	VIII.V Velocidad específica de muerte versus Concentración	35
	VIII.VI Resumen resultados fabricante.....	38
IX.	Conclusión	40
X.	Bibliografía	41
XI.	Anexos.....	45

XI.I Análisis de varianzas para la prueba del neutralizante.....	45
XI.I.I <i>Escherichia coli</i>	45
XI.I.II <i>Listeria innocua</i>	46
XI.II Análisis de varianza multifactorial para determinar la acción germicida.	48
XI.II.I <i>Escherichia coli</i>	48
XI.II.II <i>Listeria innocua</i>	50

I. Resumen

Las ETAs (Enfermedades Transmitidas por los Alimentos), son un gran problema para la industria de los alimentos, generalmente asociadas a la presencia de bacterias patógenas en los productos o superficies de los procesos productivos. Para combatir a estos microorganismos, se utilizan productos desinfectantes; agentes químicos que tienen como objetivo atacar a los elementos vitales del microorganismo, lograr su destrucción y, por tanto, causar la lisis de la célula. Uno de los desinfectantes utilizados en la industria son los compuestos clorados, donde destaca el ácido hipocloroso, uno de los más poderosos oxidantes entre los oxácidos clorados. En este estudio se analizó el efecto bactericida *in vitro* del ácido Hipocloroso (HOCl) como desinfectante determinándose la eficiencia germicida (%E), el coeficiente de dilución (η), el tiempo de reducción decimal (TRD) y la velocidad específica de muerte (k) sobre cepas de *Escherichia coli* y *Listeria innocua*. Para ello se utilizaron concentraciones de 1470 ppm, 2350 ppm y 3360 ppm del Ácido Hipocloroso durante 2, 5 y 10 min de tratamiento. Además, se estudió la relación existente entre la concentración y la velocidad específica de muerte para cada microorganismo. A partir de los 2350 ppm y 5 min de acción (condiciones recomendadas por el fabricante), se consiguió una eficiencia germicida del 99,9999% (reducción de 6 ciclos logarítmicos), tanto para *Escherichia coli* como *Listeria innocua*. En estas condiciones de proceso se determinó una velocidad específica de muerte (k) de 2,74 (min^{-1}) y un TRD de 0,83 min para *Escherichia coli* y una velocidad específica de muerte (k) de 2,73 (min^{-1}) y un TRD de 0,83 min para *Listeria innocua*. Además, el coeficiente de dilución fue de 0,2 para la *Escherichia coli* y 0,3 para *Listeria innocua*. Estos valores indican que el efecto biocida del HOCl depende más del tiempo que de la concentración del desinfectante. De la relación entre la concentración y la velocidad específica de muerte se obtuvo una relación exponencial para *Escherichia coli* ($k=1,5148e^{0,0003C}$) y una relación logarítmica para la *Listeria innocua* ($k=2,104\text{Ln}(C)-13,141$). Finalmente, se consiguió una eficiente acción biocida del Ácido Hipocloroso (HOCl) sobre *Escherichia coli* y *Listeria innocua* con las condiciones recomendadas por el fabricante.

II. Abstract

ETAs (Foodborne Diseases) are a big problem for the food industry, generally associated with the presence of pathogenic bacteria in the products or surfaces of the production processes. To combat these microorganisms, disinfectant products are used; Chemical agents whose objective is to attack the vital elements of the microorganism, achieve their destruction and, therefore, cause cell lysis. One of the disinfectants used in the industry are chlorinated compounds, where hypochlorous acid stands out, one of the most powerful oxidants among the chlorinated oxacids. In this study, the *in vitro* bactericidal effect of hypochlorous acid (HOCl) as a disinfectant was analyzed, determining the germicidal efficiency (%E), the dilution coefficient (η), the decimal reduction time (TRD) and the specific death rate (k) on strains of *Escherichia coli* and *Listeria innocua*. For this, concentrations of 1470 ppm, 2350 ppm and 3360 ppm of Hypochlorous Acid were used for 2, 5 and 10 min of treatment. In addition, the relationship between the concentration and the specific death rate for each microorganism was studied. From 2350 ppm and 5 min of action (conditions recommended by the manufacturer), a germicidal efficiency of 99.9999% (reduction of 6 logarithmic cycles) was achieved, both for *Escherichia coli* and *Listeria innocua*. Under these process conditions, a specific death rate (k) of 2.74 (min^{-1}) and a TRD of 0.83 min for *Escherichia coli* and a specific death rate (k) of 2.73 (min^{-1}) and a TRD of 0.83 min for *Listeria innocua*. Furthermore, the dilution coefficient was 0.2 for *Escherichia coli* and 0.3 for *Listeria innocua*. These values indicate that the biocidal effect of HOCl depends more on time than on the concentration of the disinfectant. From the relationship between the concentration and the specific rate of death, an exponential relationship was obtained for *Escherichia coli* ($k=1.5148e^{0.0003C}$) and a logarithmic relationship for *Listeria innocua* ($k=2.104\text{Ln}(C)-13.141$). Finally, an efficient biocidal action of Hypochlorous Acid (HOCl) on *Escherichia coli* and *Listeria innocua* was achieved under the conditions recommended by the manufacturer.

III. Introducción

La industria de alimentos debe lidiar a diario con una gran problemática como son las ETAs (Enfermedades Transmitidas por los Alimentos), lo que impacta económicamente al sector productivo. Estas ETAs, están generalmente asociadas a la presencia de bacterias patógenas y sus toxinas que se encuentran presentes en los alimentos al momento de procesarlos o se contaminan durante esta etapa (Herrera, 2016).

En la industria alimentaria, sanitización significa crear y mantener condiciones higiénicas y saludables. Este proceso puede reducir la suciedad y el crecimiento de microorganismos en los equipos lo que favorece la disminución de la contaminación de los alimentos por los microorganismos que causan enfermedades alimenticias y deterioro de los alimentos. La sanitización es más que sólo limpieza. Los alimentos o equipamientos pueden estar libre de suciedad visible y aún estar contaminado con microorganismos o químicos que pueden causar enfermedades. (Marriott, 1997)

Para lograr una efectiva sanitización y limpieza, se deben ocupar desinfectantes. Por desinfectante o sanitizante se entiende al agente químico capaz de destruir las formas vegetativas, pero no necesariamente las esporas resistentes, de microorganismos patógenos que pueden afectar desfavorablemente a la calidad de los productos y salud de las personas (Villatoro, 2008). Los desinfectantes se aplican sobre objetos materiales inertes como instrumentos y superficies con el fin de tratar o prevenir la infección (Herrera, 2016)

Un desinfectante ideal debe tener ciertas características, las cuales deben ser consideradas para su elección, estas son:

- Amplio espectro antimicrobiano
- Soluble en agua
- No tóxico a las concentraciones usadas
- Incoloro

- Bajo costo
- Rápida acción bactericida
- Fácil de usar
- Relativamente estable
- Sin residuos nocivos
- No corrosivo
- De fácil y rápida disponibilidad

El desinfectante tiene como objetivo atacar a los elementos vitales del microorganismo, lograr su destrucción y, por tanto, causar la lisis de la célula. En la industria alimentaria, debe conseguir la eliminación de los microorganismos patógenos, y la reducción hasta niveles considerados aceptables de los microorganismos alterantes (Betelgeux, 2017).

Muchos desinfectantes se utilizan solos o en combinaciones en las instalaciones de salud. Éstos incluyen los alcoholes, cloro y compuestos clorados, formaldehído, fenólicos y compuestos de amonio cuaternario. Por lo tanto, se debe tener claridad en las necesidades que se requieran suplir con el desinfectante, la selección del desinfectante debe ser cuidadosa para asegurar que se ha seleccionado el producto correcto para el uso previsto y su aplicación eficientemente (Rodríguez, 2011).

Entre los productos de mayor uso se pueden mencionar el ácido peroxacético, amonio cuaternario, hipoclorito de sodio y yodo polimérico (Villatoro, 2008).

En virtud de su capacidad como fuertes agentes oxidantes para atacar y destruir las sustancias orgánicas, todos los halógenos sirven perfectamente para operaciones de desinfección. En la desinfección en las industrias alimentarias, constituyen además los compuestos liberadores de cloro activo un importante grupo de principios activos, también de acción oxidante (Wildbrett, 2006).

Según el sitio Pure Chemistry, el cloro está disponible en tres formas químicas

1. Hipoclorito de sodio (blanqueador, lejía)
2. Hipoclorito de calcio (cloro en polvo)
3. Gas de cloro (cloro líquido)

Los hipocloritos son los productos más ampliamente utilizados de los compuestos clorados, y están disponibles como líquidos (Ej. hipoclorito de sodio) o sólido (Ej. hipoclorito de calcio) (Rodríguez, 2011).

La principal ventaja de los productos clorados es su bajo coste y que poseen un amplio rango de efectividad frente a los microorganismos. Son eficaces a baja temperatura y, generalmente, no tienen actividad residual. Su principal desventaja es su inestabilidad, tanto frente a las condiciones ambientales (luz y calor) como en presencia de materia orgánica, inconvenientes que se intenta minimizar en los formulados desinfectantes (Betelgeux, 2017).

La acción microbicida la realiza el cloro, que es un gas que no puede utilizarse en la formulación de los compuestos, por ello un medio para utilizarlo es mediante la reacción con productos cáusticos, lo que da lugar a la formación de hipoclorito de sodio, que es la base de numerosos desinfectantes. Su poder desinfectante proviene de sus propiedades oxidantes debido a la presencia del ion ClO^- , que ataca la membrana citoplasmática. El hipoclorito de sodio NaClO es una sal del ácido hipocloroso (HClO). En solución, el hipoclorito de sodio se disocia en iones sodio Na^+ y ClO^- (Betelgeux, 2017).

El ácido hipocloroso (HClO) es la denominación que se le otorga al ácido que resulta de la unión del óxido ácido de cloro con H_2O . Es un ion no disociado del cloro dependiente del oxígeno, altamente inestable y altamente reactivo. Por ser uno de los ácidos hipo halogenados más fuertes, es también uno de los más poderosos oxidantes entre los oxácidos clorados y es el responsable directo de la acción bactericida de los compuestos derivados del cloro. (Lafaurie y col., 2015). El ácido

hipocloroso es el componente activo del hipoclorito de sodio sin sus efectos adversos (Paredes, 2018). La estructura química se representa en la figura 1.

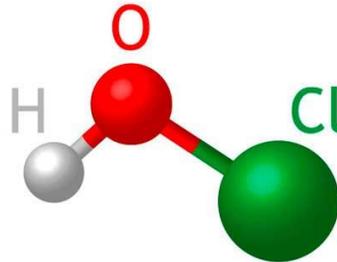


Figura 1. Estructura química Ácido Hipocloroso. Fuente: Cevallos, 2014.

A pesar de que el ácido hipocloroso es un oxidante no selectivo que reacciona hábilmente con todas las biomoléculas, puede oxidar nucleótidos, activar enzimas latentes, inactivar enzimas, romper membranas basales o membranas celulares y fragmentar proteínas (Coronado, 2011).

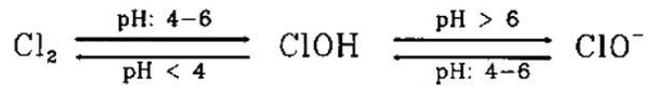
Químicamente el HOCl puede ser obtenido por diferentes métodos. Infortunadamente, la mayoría de los procedimientos obtienen soluciones de baja estabilidad, moderada actividad microbicida, con bajo porcentaje de ácido hipocloroso libre. (Lafaurie y col., 2015).

Debido a que el hipoclorito está disponible comercialmente, la acidificación de hipoclorito es el método más utilizado, conveniente y controlable. Permite la mayor generación de HOCl en solución. Consiste en acidificar el hipoclorito de sodio al mezclarlo con iones de hidrógeno disponibles en el agua. (Lafaurie y col., 2015).

Industrialmente, empresas como Aqualution, comercializan Ácido Hipocloroso obteniéndolo mediante electrodiálisis (ED), utilizando sal y agua en celdas electroquímicas. En la producción industrial se consigue soluciones estables de ácido hipocloroso producidas mediante tecnología de activación electroquímica (ECA) (ICB, 2023).

En la reacción de formación del ácido hipocloroso a partir del cloro molecular, el equilibrio se desplaza hacia la formación de ácido hipocloroso cuando el pH del

agua es superior a 4. Sin embargo, cuanto mayor es el pH del agua, el ácido hipocloroso (ácido débil) tiende a ionizarse y el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la formación de ión hipoclorito, cuya potencial redox es menor y la acción germicida mucho más lenta que la del ácido hipocloroso, llegando a ser de 10 a 20 veces más eficaz que el ácido hipocloroso (Figura 2) (Pérez, 1995)



pH 6: 95 % ClOH
pH 7,5: 50 % ClOH
pH 8,5: 10 % ClOH

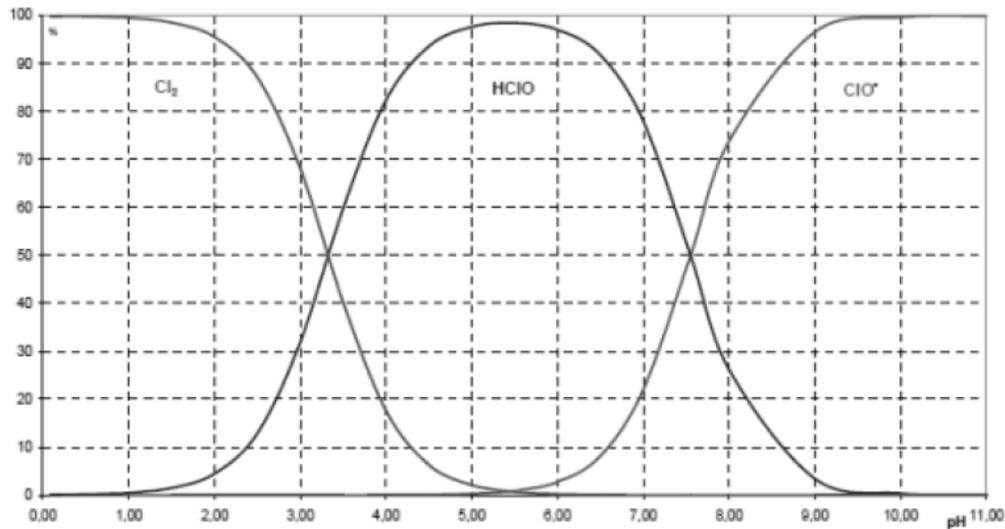


Figura 2. Equilibrio químico a distintos pH del ácido hipocloroso. Fuente: Pérez, 1995.

A un pH cercano a 5 casi todo el cloro presente está en forma de ácido hipocloroso. A 25 °C y a un pH de 7,5 (cercano a neutro), la mitad del cloro presente en la solución está en forma de ión hipoclorito y la otra mitad como ácido hipocloroso. A un pH de 8,5 casi todo el cloro está presente como ion hipoclorito (Purechemistry, 2020).

Las especies químicas en la solución de ácido hipocloroso son acuosas y se introducirán en el medio ambiente acuático a través de la descarga en aguas

superficiales. Cuando el pH de la solución de ácido hipocloroso es un ácido débil, la especie de oxígeno dominante es el ácido hipocloroso. Es bien sabido que la principal actividad antimicrobiana de las soluciones de ácido hipocloroso e hipoclorito se debe a la actividad del componente ácido y, por lo tanto, cuando la operación entre pH 5 y 7 se va a maximizar el ácido disponible y la eficacia antimicrobiana resultante (Harnell & col., 2017)

La ventaja del ácido hipocloroso es su efectividad, potencia y capacidad para ser utilizado como desinfectante en diferentes áreas, se considera ideal porque tiene propiedades que lo hacen altamente efectivo en el área o superficie a tratar, eficaz e inofensivo para el medio ambiente, 100% biodegradable, brinda seguridad en su uso y manejo, porque es simple y no tóxico, es económico y asequible para los consumidores. (productos químicos Chile, Oregón 2020)

Pero debido a la inestabilidad y reactividad del ácido hipocloroso/ion hipoclorito, estas soluciones deben prepararse y usarse antes de 24 h (Purechemistry, 2020).

La actividad microbicida del HOCl es más efectiva para formas bacterianas que para esporas. Abarca microorganismos clínicamente relevantes como lo son bacterias Gram negativas, Gram positivas, parásitos y hongos. (Paredes, 2018)

La actividad antimicrobiana del HOCl es a causa de la pérdida respiratoria en las membranas bacterianas, debido a una reacción irreversible con las enzimas de membrana que contienen azufre y grupos hemo, así como de proteínas estructurales, causando la muerte celular. El daño ocasionado a las proteínas indica un efecto negativo en la transducción y el transporte de energía, lo que conduce a hidrólisis del ATP. La fragmentación de las proteínas también interrumpe la síntesis de ADN. La reacción de HOCl con los grupos aminos de los nucleótidos produce cloraminas reactivas, las cuales rompen los enlaces de hidrógeno y disocian las dobles cadenas de ADN. El HOCl reacciona con ácidos grasos insaturados produciendo clorohidrininas que provocan lisis celular y toxicidad (Muñoz-Castellanos, 2021). Este mecanismo de acción del Ácido Hipocloroso se representa en la Figura 3.

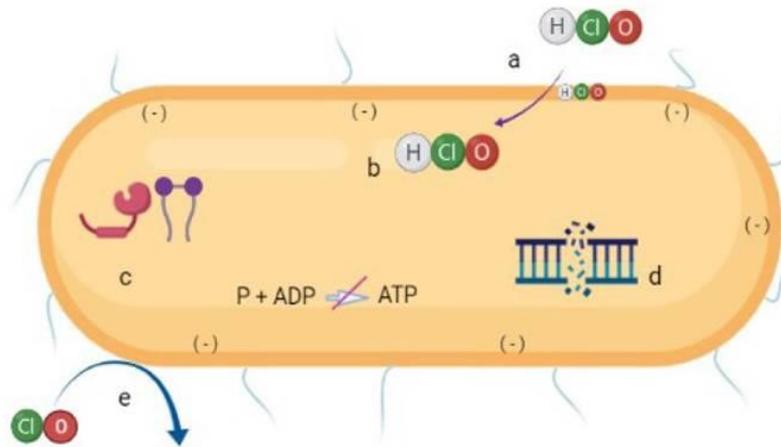


Figura 3. El HOCl penetra la célula bacteriana debido a su carga neutra (a), afectando los componentes de la membrana (b), como transportadores, proteínas y ATPasa; degrada lípidos y proteínas (c), e interrumpe la síntesis del ADN (d). También puede ocurrir oxidación bacteriana por contacto con el ion hipoclorito (ClO⁻) (e). Fuente: Muñoz-Castellanos, 2021

En las bacterias Gram negativas se produce una reacción enzimática irreversible entre el HOCl con las proteínas de membrana, produciendo daños estructurales que alteran la permeabilidad celular y afectando la viabilidad bacteriana. En bacterias Gram positivas, el HOCl actúa sobre los grupos amino de la glicina presente en el peptidoglucano, por lo que la cloración en este grupo de microorganismos difiere en cuanto al blanco de acción. La acción antimicrobiana del HOCl es mayor para microorganismos Gram negativos que para la flora Gram positiva (Lafaurie, 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 (Givovich, 2018).

Listeria monocytogenes es un bacilo pequeño Gram positivo causante de la listeriosis, la cual es una enfermedad con una tasa de mortalidad de aproximadamente 28%, particularmente en los grupos más vulnerables. 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 (Givovich, 2018).

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 (Givovich, 2018).

El presente estudio tiene como objetivo determinar el efecto bactericida *in vitro* de Ácido Hipocloroso y su coeficiente de dilución, en concentraciones usadas para el uso de desinfección de superficies, frente a cepas de *Listeria innocua* y *Escherichia coli*.

IV. Hipótesis

El Ácido Hipocloroso en la concentración y tiempo recomendados por el fabricante, disminuye o elimina la carga microbiana frecuentemente presente en la industria alimentaria.

V. Objetivos

V.I Objetivo General

Determinar la eficiencia germicida y el coeficiente de dilución del Ácido Hipocloroso *in vitro*, frente a cepas de *Listeria innocua* y *Escherichia coli*.

V.II Objetivos específicos

Cuantificar la eficiencia germicida *in vitro* del Ácido Hipocloroso frente a cepas de *Listeria innocua* y *Escherichia coli*.

Determinar la velocidad específica de muerte y tiempo de reducción decimal de ambas cepas frente al Ácido Hipocloroso.

Obtener el coeficiente de dilución del Ácido Hipocloroso para la *Listeria innocua* y *Escherichia coli*.

Obtener una expresión para la relación entre la velocidad específica de muerte con la concentración del desinfectante.

VI. Materiales y Métodos

VI.I Materiales:

VI.I.I Insumos:

Cepas de *Listeria innocua* y *Escherichia coli*

Desinfectante comercial: Ácido Hipocloroso

Medios de cultivo: Agar Soya Tripticasa (TSA)
Caldo Soya Tripticasa (TSB)

Neutralizante (Herrera, 2016):

- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$: 3,92g
- Diluyente c.s.p. 250ml:
 - Peptona 1g
 - NaCl 8,5g
 - H_2O 1000ml

VI.I.II Equipos:

Autoclave ORTHAM.

Vortex Mixer KMC-1300V Vision Scientific Co. Ltda.

Estufa de cultivo Daihan Labtech Co. Ltda.

Contador de colonias Colony counter Stuart.

Otros equipos y materiales de trabajo del Laboratorio de Microbiología Aplicada de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

VI.II Métodos

VI.II.I Recuento inicial de las cepas

Las cepas de *Escherichia coli* y *Listeria innocua* se cuantificaron usando el método de recuento en placa de Petri. El método consistió en adicionar un volumen de 1 mL de la muestra a una placa Petri estéril para luego verter agar nutritivo licuado y temperado (a 45°C) a la placa, se dejó solidificar e incubar las placas invertidas a 35°C durante 48 h. (Marchand, 2002)

VI.II.II Control del neutralizante

Este control fue usado para determinar la efectividad del neutralizante y asegurar también no presentar efecto bactericida sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Listeria innocua*.

Este procedimiento consistió en disponer 9 ml de la solución desinfectante a la concentración conocida de las cepas, luego se adicionó 1 mL de neutralizante y se dejó reaccionar durante 10 min a una temperatura aproximada de 20°C a 25°C. Posteriormente se inoculó una concentración aproximada de 10^3 ufc/mL de *Escherichia coli* y *Listeria innocua* (por separado); se agitó cuidadosamente el tubo y se dejó reposar durante 5 min. Posteriormente, se realizó un recuento en placa, incubando a 35°C durante 24 h. (Arriagada, 2006)

VI.II.III Determinación de la actividad antimicrobiana del desinfectante

La actividad antimicrobiana o bactericida del Ácido Hipocloroso se determinó por medio de la cinética de muerte de las cepas de *Escherichia coli* y *Listeria innocua*. Para ello se tomó una alícuota de 1 ml del cultivo puro de la cepa en estudio y se colocó en contacto con 100 ml de solución desinfectante, esta mezcla homogenizada tiene una concentración inicial de 10^7 UFC/ml. De esta suspensión se tomó una alícuota de 1 ml la cual se depositó en 9 ml de una solución

neutralizante a los 0, 2, 5, y 10 min de acción. Se realizaron diluciones decimales para efectuar el recuento de microorganismos sobrevivientes sembrando en placa Petri 1 ml de las tres últimas diluciones usando como medio de cultivo TSA.

Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h – 48 h. Posteriormente, se efectuó el recuento de las colonias. Este procedimiento se realizó para el desinfectante a concentraciones de 1470, 2350 y 3360 ppm.

Los tiempos y concentraciones fueron elegidos en base a la concentración y tiempo de acción recomendados por el fabricante del desinfectante utilizado, 2350 ppm y 5 minutos de acción. Estos valores se tomaron como los valores centrales, por lo que se eligió una concentración mayor y una concentración menor, al igual que para los tiempos de acción. El tiempo de acción 0 es el utilizado para determinar con posterioridad la efectividad del desinfectante sabiendo la concentración inicial de las cepas.

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:

VI.II.III.I Eficiencia germicida (%E)

Se determinó como el porcentaje de microorganismos que fueron destruidos por la acción del desinfectante, y se obtuvo a partir de la siguiente expresión (Herrera, 2016):

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

En donde:

N_0 = número de microorganismos iniciales.

N_t = número de microorganismos sobrevivientes al tiempo t.

VI.II.III.II Velocidad específica de muerte

La velocidad específica de muerte k corresponde a la pendiente de la curva en el gráfico $\ln N_t$ vs. t y se obtuvo a partir de la siguiente expresión matemática (López, 2002):

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

En donde:

N_0 = número de microorganismos iniciales.

N_t = número de microorganismos sobrevivientes al tiempo t .

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

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

VI.II.III.III Tiempo de reducción decimal

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

El tiempo de reducción decimal (TRD) se determinó por la siguiente expresión (Herrera, 2016):

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

En donde:

k = velocidad específica de muerte.

VI.II.III.IV Coeficiente de dilución (η)

El coeficiente de dilución expresa la relación entre la concentración del desinfectante y el tiempo de acción para obtener una efectividad igual frente a un determinado microorganismo, de acuerdo a la siguiente expresión (Arriagada, 2006):

$$C^n * t = constante$$

En donde:

C = concentración del desinfectante.

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

η = coeficiente de dilución.

Luego, el coeficiente de dilución se obtiene a partir de la siguiente expresión (Arriagada, 2006):

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

En donde:

t = tiempo.

C = concentración.

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

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

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

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

VI.II.IV 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. Se consideró como factores la concentración y el tiempo de acción, de manera de determinar si existían diferencias significativas en cada caso, con un intervalo de confianza del 95%.

VII. Resultados

VII.I Control del neutralizante

Para evaluar la efectividad del neutralizante se utilizaron 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 incorporó el ácido hipocloroso como el biocida en estudio.

En la Tabla 1 se muestran los resultados promedio obtenidos en los ensayos para el control de neutralizante.

Tabla 1. Control del neutralizante.

	<i>Escherichia coli</i> (ufc/ml)	<i>Listeria innocua</i> (ufc/ml)
Control	8,9 x 10 ⁸ a	3,2 x 10 ¹⁰ a
Neutralizante	1,0 x 10 ⁹ a	6,2 x 10 ⁸ a
Neutralizante + Biocida	3,1 x 10 ⁹ a	4,8 x 10 ⁸ a

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

Como se puede observar, los recuentos, para las dos cepas en estudio, no parecen tan similares entre sí. Sin embargo, 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% (El detalle estadístico se observa en Anexo XI.I)

El tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) es un buen agente decolorante que neutraliza todos los residuos halógenos (CNTA, 2022).

En estudios similares, como el realizado por Kemp & col., (2000), también se observó que el tiosulfato logró una neutralización efectiva sobre compuestos clorados sin afectar la supervivencia de cepas de *Escherichia Coli*.

Se puede concluir por tanto que el neutralizante utilizado cumple la función de inactivar al desinfectante sin tener un efecto biocida sobre las cepas en estudio.

VII.II Acción bactericida in vitro del desinfectante

VII.II.I *Escherichia coli*

En la Figura 4 se presenta la cinética de muerte de *Escherichia coli* al utilizar el Ácido Hipocloroso como desinfectante a distintas concentraciones y tiempos de acción.

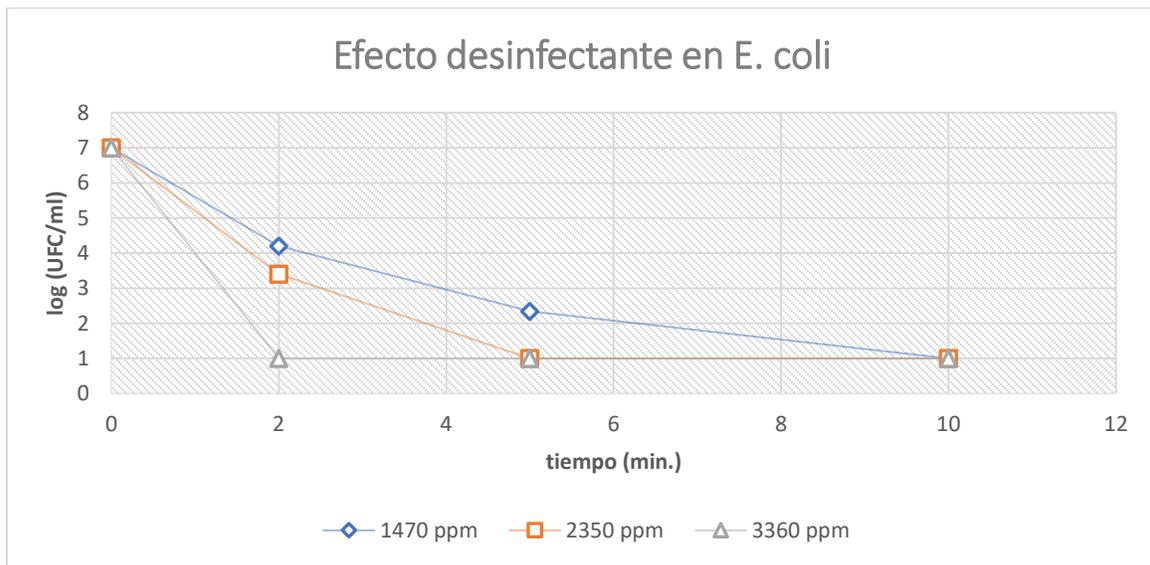


Figura 4. Efecto del ácido hipocloroso a concentraciones de 1470, 2350 y 3360 ppm en *Escherichia coli* a diferentes tiempos.

Se puede observar que a la mayor concentración de 3360 ppm se alcanzó una disminución de 6 ciclos logarítmicos en el menor tiempo de tratamiento (2 min). A una concentración de 2350 ppm, la reducción de la misma cantidad de ciclos logarítmicos se consiguió a los 5 min del tratamiento. Y el desinfectante con la menor

concentración (1470 ppm) consiguió la reducción de 6 ciclos logarítmicos en el mayor tiempo de tratamiento (10 min).

Cabe mencionar que la concentración que recomienda el fabricante del desinfectante es 2350 ppm y el tiempo requerido son 5 min, es decir que se logra la reducción de 6 ciclos logarítmicos con dichos parámetros.

En la tabla 2 se presenta un resumen de los promedios obtenidos del recuento de *Escherichia coli* a distintos tiempos y concentraciones del Ácido Hipocloroso junto con los cálculos de eficiencia germicida, velocidad específica de muerte, tiempo de reducción decimal y coeficiente de dilución correspondientes.

Tabla 2. Tabla resumen actividad germicida del ácido hipocloroso a distintas concentraciones sobre Escherichia coli.

Concentración (ppm)	Tiempo (min)	N (UFC/ml)	E (%)	k (min ⁻¹)	TRD (min)	η
1470 ^a	0 ^a	9,6 x10 ⁶				0,2
	2 ^b	1,5 x10 ⁴	99,8391	3,22	0,72	
	**5 ^{bc}	2,2 x10 ²	99,9977	2,13	1,08	
	10 ^c	<1,0 x 10 ¹	99,9999	1,38	1,67	
*2350 ^a	0 ^a	9,8 x10 ⁶				
	2 ^b	2,6 x10 ³	99,9739	4,13	0,56	
	**5 ^{bc}	<1,0 x 10 ¹	99,9999	2,75	0,83	
	10 ^c	<1,0 x 10 ¹	99,9999	1,38	1,67	
3360 ^a	0 ^a	9,5 x10 ⁶				
	2 ^b	<1,0 x 10 ¹	99,9999	6,68	0,33	
	**5 ^{bc}	<1,0 x 10 ¹	99,9999	2,76	0,84	
	10 ^c	<1,0 x 10 ¹	99,9999	1,38	1,67	

*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 2, para la eficiencia germicida se ve que a la menor concentración del desinfectante se alcanzó un 99,9999% de eficiencia recién a los 10 min de acción, lo cual fue similar con lo obtenidos para la concentración indicada por el fabricante de 2350 ppm entre los 5 y 10 min. La mayor eficiencia alcanzada, que fue de un 99,9999% se consiguió entonces a partir del tiempo y concentración recomendados por el fabricante (2350 ppm y 5 min de acción), en donde se pudo comprobar con la Figura 4 que se lograron reducir 6 ciclos logarítmicos de *Escherichia coli*, siendo así un desinfectante apropiado para este microorganismo según lo detallado por Givovich (2018) al indicar que un buen desinfectante debe reducir al menos 5 ciclos logarítmicos.

En cuanto a la velocidad específica de muerte (k), que se puede observar en la Tabla 2, dentro de una misma concentración el valor disminuyó a medida que aumentó el tiempo de acción con el desinfectante, esto indica que la población bacteriana va disminuyendo a una menor velocidad con el pasar del tiempo pues la concentración del desinfectante también va disminuyendo con el tiempo. Ahora, en el mismo tiempo de acción para las 3 concentraciones se puede ver que a medida que aumenta la concentración el valor de k va aumentando, lo que indica que al aumentar la concentración se disminuye a una mayor velocidad la población inicial del microorganismo al contener una mayor concentración del Ácido Hipocloroso. Esta determinación tiene validez al comparar la concentración más baja con la concentración recomendada por el fabricante.

Para el tiempo de reducción decimal (TRD), dentro de una misma concentración el valor aumentó a medida que el tiempo de tratamiento fue mayor, esto indica que se necesitó más tiempo para poder disminuir en un ciclo logarítmico la cantidad de microorganismos sobrevivientes. Mientras, al mismo tiempo de acción en las 3 concentraciones se puede ver que a medida que aumentó la concentración el valor de TRD disminuyó, lo que quiere decir que al aumentar la concentración del Ácido Hipocloroso se necesita menos tiempo para lograr una misma reducción.

Finalmente, el coeficiente de dilución calculado para *Escherichia coli* que se muestra en la Tabla 2 fue de 0,2. Al ser menor a 1, se puede inferir que el efecto biocida depende más del tiempo de acción que de la concentración del desinfectante.

VII.II.II *Listeria innocua*

En la Figura 5 se presenta la cinética de muerte de *Listeria innocua* al utilizar el desinfectante en estudio a distintas concentraciones y tiempos de acción.

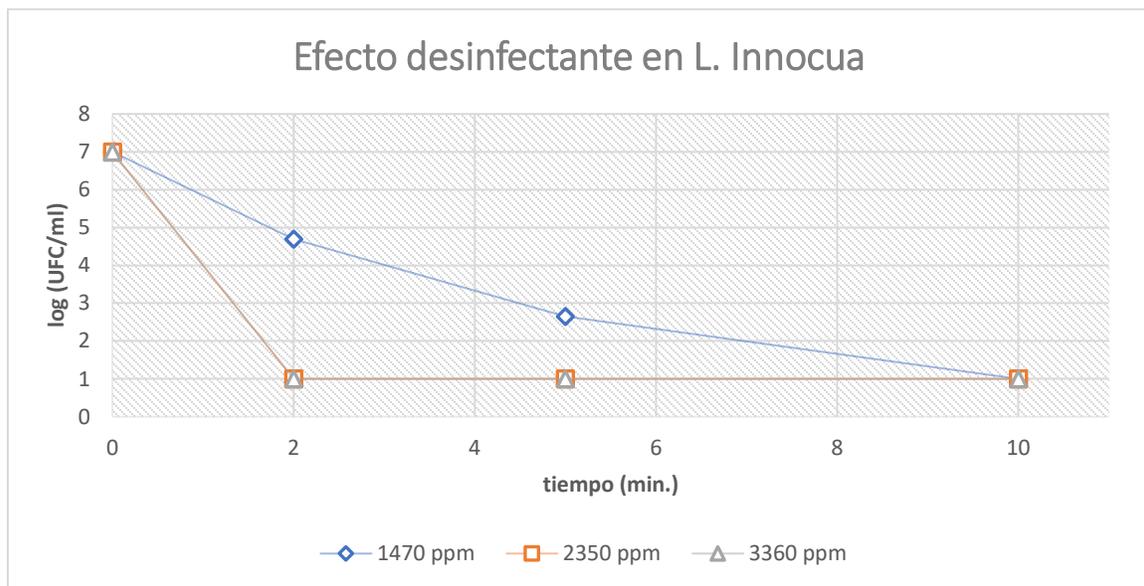


Figura 5. Efecto del ácido hipocloroso a concentraciones de 1470, 2350 y 3360 ppm en *Listeria innocua* a diferentes tiempos.

Se puede observar que a las dos concentraciones mayores de 2350 y 3360 ppm se alcanzó una disminución de 6 ciclos logarítmicos en el menor tiempo de tratamiento (2 min). La menor concentración también logra una reducción de 6 ciclos logarítmicos, alcanzándose a partir del tiempo mayor de tratamiento (10 min).

Cabe mencionar que la concentración que recomienda el fabricante del desinfectante es 2350 ppm y el tiempo requerido son 5 min, es decir se logra la reducción de 6 ciclos logarítmicos con dichos parámetros.

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 (k), tiempo de reducción decimal y coeficiente de dilución.

Tabla 3. Tabla resumen actividad germicida del ácido hipocloroso a distintas concentraciones sobre *Listeria innocua*.

Concentración (ppm)	Tiempo (min)	N (UFC/ml)	E (%)	K (min ⁻¹)	TRD (min)	η
1470 ^a	0 ^a	9,3 x 10 ⁶				
	2 ^b	5,0 x 10 ⁴	99,4671	2,62	0,88	
	**5 ^b	4,4 x 10 ²	99,9952	1,99	1,16	
	10 ^b	<1,0 x 10 ¹	99,9999	1,37	1,67	
*2350 ^a	0 ^a	9,7 x 10 ⁶				
	2 ^b	<1,0 x 10 ¹	99,9999	6,89	0,33	0,3
	**5 ^b	<1,0 x 10 ¹	99,9999	2,76	0,83	
	10 ^b	<1,0 x 10 ¹	99,9999	1,38	1,67	
0 ^a	9,4 x 10 ⁶					
3360 ^a	2 ^b	<1,0 x 10 ¹	99,9999	6,88	0,33	
	**5 ^b	<1,0 x 10 ¹	99,9999	2,75	0,84	
	10 ^b	<1,0 x 10 ¹	99,9999	1,38	1,67	

*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 3, para la eficiencia germicida en todas las concentraciones se alcanzó un 99,9999% de eficiencia. Este valor se consiguió a partir del mayor tiempo de tratamiento con la menor concentración en estudio (1470 ppm). En el caso de las otras concentraciones (2350 y 3360 ppm) para todos los

tiempos se logró el mismo nivel de eficiencia germicida. siendo así un desinfectante apropiado para la *Listeria innocua* según lo detallado por Givovich (2018) al indicar que un buen desinfectante debe reducir al menos 5 ciclos logarítmicos, consiguiéndose para este caso de estudio la reducción de 6 ciclos logarítmicos.

En cuanto a la velocidad específica de muerte (k), que se puede observar en la Tabla 3, dentro de una misma concentración el valor disminuyó a medida que aumentó el tiempo de acción con el desinfectante, esto indica que la población bacteriana va disminuyendo a una menor velocidad con el pasar del tiempo pues la concentración del desinfectante también va disminuyendo con el tiempo. Ahora, al mismo tiempo de acción en las 3 concentraciones se puede ver valores similares al tener el mismo efecto bactericida a partir de la concentración más baja lo que indica que al aumentar la concentración se disminuye a una mayor velocidad la población inicial del microorganismo al contener una mayor concentración del Ácido Hipocloroso. Esta determinación tiene validez al comparar la concentración más baja con la concentración recomendada por el fabricante, ya que esta última con la concentración mayor llegan a ser muy similares los valores.

Para el tiempo de reducción decimal (TRD), dentro de una misma concentración el valor aumentó a medida que aumentó el tiempo de acción con el desinfectante, esto indica que se necesitó más tiempo para poder disminuir en un ciclo logarítmico la cantidad de microorganismos sobrevivientes. Mientras, al mismo tiempo de acción en las 3 concentraciones se puede ver que a medida que aumentó la concentración el valor de TRD disminuyó, lo que quiere decir que al aumentar la concentración del Ácido Hipocloroso se necesita menos tiempo para lograr una misma reducción.

Finalmente, el coeficiente de dilución calculado para *Listeria innocua* que se muestra en la Tabla 3 fue de 0,3. Al ser menor a 1, se puede inferir que el efecto biocida depende más del tiempo de acción que de la concentración del desinfectante.

VIII. Discusión comparativa

VIII.I Eficiencia germicida

En la Tabla 4 se muestra de manera comparativa la eficiencia germicida del Ácido Hipocloroso frente a las cepas en estudio.

Tabla 4. Comparación de la eficiencia germicida del Ácido Hipocloroso frente *Escherichia coli* y *Listeria innocua*.

Concentración (ppm)	Tiempo (min)	E (%)	
		<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>
1470	2	99,8391	99,4671
	**5	99,9977	99,9952
	10	99,9999	99,9999
*2350	2	99,9739	99,9999
	**5	99,9999	99,9999
	10	99,9999	99,9999
3360	2	99,9999	99,9999
	**5	99,9999	99,9999
	10	99,9999	99,9999

*Concentración recomendada por el fabricante

**Tiempo de acción recomendado por el fabricante

Como se observa en la Tabla 4, con las condiciones recomendadas por el fabricante en cuanto a concentración y tiempo (2350 ppm y 5 min) se puede asegurar la disminución de 6 ciclos logarítmicos para ambas cepas, siendo el Ácido Hipocloroso un desinfectante adecuado para atacar ambos microorganismos (Givovich, 2018). En el caso de la *Listeria innocua*, con una concentración de 1470 ppm se consiguió el mismo efecto germicida, con 10 min de tratamiento.

Lo obtenido en esta investigación fue concordante con otros estudios como lo realizado por Castillo, et al., (2015); Coronado, et al., (2011) donde también con la acción del Ácido Hipocloroso como desinfectante lograron un 99,9999% de eficiencia germicida, disminuyendo la viabilidad de bacterias como *Streptococcus mutans*, *Enterobacter cloacae*, *P. gingivalis*, entre otras, siendo tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas.

El efecto biocida del HOCl sobre las bacterias Gram negativas, por ejemplo, *Escherichia coli*, se explica ya que estas tienen azufre y grupos hem (ricos en hierro) en su membrana lo que provoca una reacción irreversible HOCl/proteínas de membrana, produciendo daño estructural, y alteración de la permeabilidad celular, afectando su viabilidad. En bacterias Gram positivas, como la *Listeria innocua*, el HOCl oxida los residuos de glicina presentes en el peptidoglicano (Castillo, 2015).

Otras investigaciones con distintas concentraciones (1, 10, 80 y 100 ppm) y tiempos de acción (15, 30, 45 y 60 min) han mostrado que en los tiempos más prolongados de tratamiento y en mayores concentraciones se consiguió una buena eficiencia germicida sobre cepas como *Escherichia coli* utilizando desinfectantes clorados (Velásquez, 2018). En este caso, y contrario a lo que se desarrolló en esta investigación, los tiempos de acción fueron mucho mayores y las concentraciones menores. A pesar de esto, se consiguió el mismo efecto y eficiencia.

VIII.II Velocidad específica de muerte

La Tabla 5 muestra los resultados de la velocidad específica de muerte de manera comparativa entre las cepas en estudio.

Tabla 5. Comparación de la velocidad específica de muerte de los microorganismos en estudio frente al Ácido Hipocloroso.

Concentración (ppm)	Tiempo (min)	k (min ⁻¹)	
		<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>
1470	2	3,22	2,62
	**5	2,13	1,99
	10	1,38	1,37
*2350	2	4,13	6,89
	**5	2,75	2,76
	10	1,38	1,38
3360	2	6,68	6,88
	**5	2,76	2,75
	10	1,38	1,38

*Concentración recomendada por el fabricante

**Tiempo de acción recomendado por el fabricante

Como se puede ver en la Tabla 5 la velocidad específica de muerte fue diferente para ambas cepas cuando se usó la concentración más baja estudiada. A partir de la concentración y tiempo recomendado por el fabricante ambas cepas actuaron de la misma manera ante el Ácido Hipocloroso. Esto quiere decir que a una menor concentración del desinfectante la bacteria Gram positiva (*Listeria innocua*) disminuye a una velocidad mayor su población inicial que la bacteria Gram negativa (*Escherichia coli*). Al incorporar a las cepas la concentración recomendada por el fabricante y una concentración mayor, la velocidad de muerte es similar entre ambos tipos de bacterias.

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).

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 (Givovich, 2018). 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. (Bragg et al., 2014)

VIII.III Tiempo de reducción decimal

En la tabla 6 se muestran los resultados de los valores del tiempo de reducción decimal (TRD) calculados para cada tiempo y concentración entre las cepas en estudio.

Tabla 6. Comparación del tiempo de reducción decimal de los microorganismos en estudio frente al Ácido Hipocloroso.

Concentración (ppm)	Tiempo (min)	TRD (min)	
		<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>
1470	2	0,72	0,88
	**5	1,08	1,16
	10	1,67	1,67
*2350	2	0,56	0,33
	**5	0,83	0,83
	10	1,67	1,67
3360	2	0,33	0,33
	**5	0,84	0,84
	10	1,67	1,67

*Concentración recomendada por el fabricante

**Tiempo de acción recomendado por el fabricante.

Como se puede ver en la Tabla 6, las mayores diferencias que se presentaron fueron para la concentración menor estudiada, en donde la acción del desinfectante en la cepa de *Listeria innocua* requiere más tiempo del que se necesita para la cepa de *Escherichia coli*, y lograr así reducir en un ciclo logarítmico la cantidad de microorganismos restantes en el menor tiempo de tratamiento.

A partir de la concentración recomendada por el fabricante y el tiempo de acción recomendado los valores de TRD se igualaron para ambas cepas bacterianas, lo que quiere indicar que al aumentar la concentración de Ácido Hipocloroso por sobre el valor recomendado por el fabricante se está obteniendo el mismo resultado, se necesita un menor tiempo para lograr la reducción del ciclo logarítmico.

VIII.IV Determinación del coeficiente de dilución (η)

La Tabla 7 muestra los valores del coeficiente de dilución calculados para cada microorganismo en estudio, frente al Ácido Hipocloroso.

Tabla 7. Coeficiente de dilución para *Escherichia coli* y *Listeria innocua*

Coeficiente de dilución	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria innocua</i>
	0,2	0,3

Para la cepa de *Escherichia coli* se obtuvo un valor de 0,2, mientras que para la cepa de *Listeria innocua* se obtuvo un valor de 0,3.

Ambos valores calculados son menores a 1. Esto determina que para ambas cepas el efecto biocida depende más del tiempo de acción que de la concentración del desinfectante.

En compuestos con coeficiente de dilución altos (mayores que 1) es en donde el control de la dilución es crítico ya que pequeñas diferencias de concentración se traducen en grandes diferencias de eficiencia (Cerra, 2013; Almonte, 2019). En este

caso los coeficientes de dilución obtenidos, al ser menores a 1, explican que el efecto bactericida se vio afectado en mayor medida por el tiempo de exposición al desinfectante para lograr la eficiencia descrita en cada cepa. Esto se ve reforzado con el análisis estadístico del recuento de microorganismos ya que no existieron diferencias significativas entre las concentraciones.

VIII.V Velocidad específica de muerte versus Concentración

Existe una relación que permite pronosticar la velocidad de una reacción de acuerdo con ciertos parámetros, como por ejemplo la temperatura.

Esta relación fue llevada a una ecuación, la Ecuación de Arrhenius:

$$k = Ae^{-\left(\frac{Ea}{RT}\right)}$$

Donde:

k= constante cinética (velocidad)

A= factor de frecuencia

Ea= Energía de activación

R= constante de los gases

T= temperatura

Según esta ecuación, k aumenta de modo exponencial cuando aumenta la temperatura. Esto también se ha podido comprobar de manera experimental, en donde se observó que la velocidad de una reacción química aumenta al incrementar la temperatura. En tanto que, aumentará la constante de velocidad de reacción al aumentar la temperatura y al disminuir la energía de activación. (Huerta, 2019)

La ecuación de Arrhenius también es útil para conocer la Energía de Activación y observar la dependencia con la velocidad de reacción. El valor de la Energía de activación nos da una idea de cómo responde la velocidad con respecto a cambios en la temperatura, es decir, una Energía de Activación alta se corresponde a una velocidad de reacción muy sensible a la temperatura (con una pendiente pronunciada), mientras que, una Energía de Activación pequeña corresponde a una velocidad de reacción relativamente poco sensible a variaciones en la temperatura. En cambio, si se conoce la Energía de Activación y el valor de constante de velocidad de reacción a una determinada temperatura, el modelo permite predecir la velocidad de reacción a otra temperatura dada. (Barbisan, 2022)

En campos como la ingeniería de los materiales y de los alimentos, esta Ecuación se ha desarrollado e implementado en modelos que permiten predecir propiedades y comportamientos a partir de cambios en las temperaturas de reacción. Es así como se puede llegar a determinar la velocidad específica de crecimiento o muerte microbiana dependiente de la temperatura.

Sin embargo, no se ha encontrado una relación de la velocidad específica de muerte respecto a la concentración de cierto desinfectante, por lo que no es posible predecir el resultado de ello.

Debido a ello en esta memoria se plantea la relación empírica obtenida para el Ácido Hipocloroso en las concentraciones determinadas (1470, 2350 y 3360 ppm) en específico para *Listeria innocua* y *Escherichia coli*.

En la Figura 6 se presenta la relación de la velocidad específica de muerte para *Escherichia coli* respecto a las concentraciones de Ácido Hipocloroso.

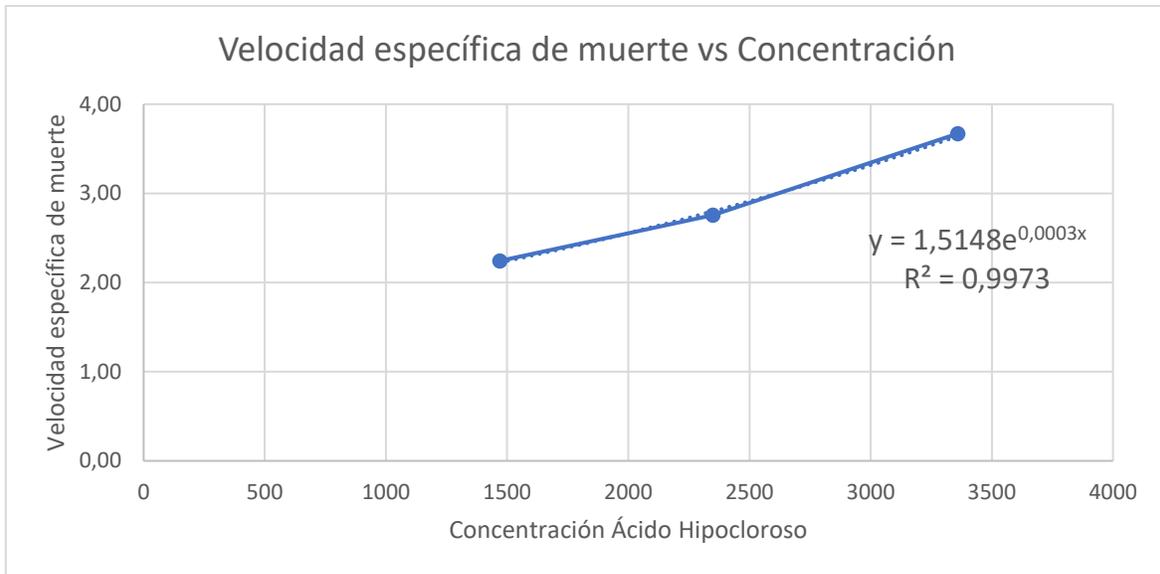


Figura 6. Efecto del ácido hipocloroso a concentraciones de 1470, 2350 y 3360 ppm en *Escherichia coli* a diferentes tiempos.

Como se puede apreciar en la Figura 6 para las condiciones específicas de este estudio (desinfectante Ácido Hipocloroso a concentraciones de 1470, 2350 y 3360 ppm) se puede obtener una relación exponencial de los parámetros. Al igual que como sucede con la ecuación de Arrhenius, con las condiciones de estudio podemos predecir que al aumentar la concentración del desinfectante la velocidad específica de muerte aumentará exponencialmente.

La ecuación de la recta queda como:

$$k = 1,5148e^{0,0003C}$$

En la Figura 7 se presenta la relación de la velocidad específica de muerte para *Listeria innocua* respecto a las concentraciones de Ácido Hipocloroso.

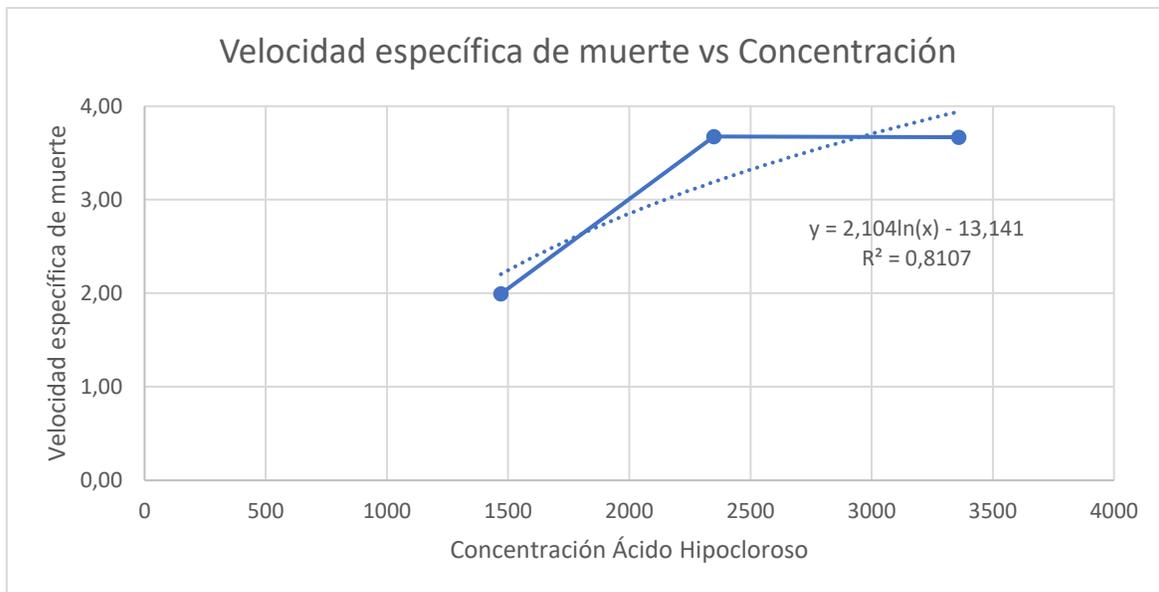


Figura 4. Efecto del ácido hipocloroso a concentraciones de 1470, 2350 y 3360 ppm en *Listeria innocua* a diferentes tiempos.

Como se puede apreciar en la Figura 7 para las condiciones específicas de este estudio (desinfectante Ácido Hipocloroso a concentraciones de 1470, 2350 y 3360 ppm) se puede obtener una relación logarítmica de los parámetros. Esto nos señala que con las condiciones de estudio podemos predecir que al aumentar la concentración del desinfectante la velocidad específica de muerte aumentará lentamente hasta que sea una constante en el tiempo.

La ecuación de la recta queda como:

$$k = 2,104Ln(C) - 13,141$$

VIII.VI Resumen resultados fabricante

En la Tabla 8 se muestra un resumen general de la eficiencia germicida, velocidad específica de muerte y tiempo de reducción decimal para ambas cepas en la recomendación de fabricante.

Tabla 8. Resumen de los resultados del desinfectante a la concentración y tiempo recomendado por el fabricante (2350 ppm por 5 min)

	E (%)	k (min ⁻¹)	TRD (min)
<i>Escherichia coli</i>	99,9999	2,75	0,83
<i>Listeria innocua</i>	99,9999	2,76	0,83

Como se muestra en la Tabla 8, el Ácido Hipocloroso, aplicado a la concentración y tiempo de acción recomendados por el fabricante, presentó una eficiencia de 99,9999% para ambas cepas bacterianas, es decir, se logró una reducción de 6 ciclos logarítmicos tanto como para *Escherichia coli* como para *Listeria innocua*.

En otros estudios como el realizado por López, et al., (2016), para distintos microorganismos, pudieron concluir también, según los valores de k y TRD, la eficiencia de un desinfectante, siendo una mejor opción el cual tiene un k mayor y un TRD menor.

En este caso. para la velocidad específica de muerte y el tiempo de reducción decimal se obtuvieron los mismos valores, para ambas cepas, lo que explica que el desinfectante en estudio, HClO, tuvo el mismo efecto biocida para ambas cepas en las condiciones que el fabricante recomienda.

Estos resultados sugieren que a las recomendaciones establecidas por el fabricante la acción del biocida sería suficiente para lograr una desinfección que asegure la inocuidad.

IX. Conclusión

- Se cuantificó la eficiencia germicida *in vitro* del Ácido Hipocloroso frente a cepas de *Listeria innocua* y *Escherichia coli*, obteniéndose una reducción de 6 ciclos logarítmicos, es decir, un 99,9999% de eficacia para ambas cepas con las condiciones recomendadas por el fabricante en cuanto a concentración y tiempo (2350 ppm y 5 min). Se considera así al Ácido Hipocloroso como un desinfectante adecuado para atacar ambos microorganismos.
- Se determinó la velocidad específica de muerte y tiempo de reducción decimal de ambas cepas frente al Ácido Hipocloroso. Para las dos cepas de estudio, estos valores fueron: $2,75 \text{ min}^{-1}$ y 0,83 minutos, respectivamente, frente a las condiciones de concentración y tiempo de tratamiento recomendadas por el fabricante.
- Se obtuvo el coeficiente de dilución del Ácido Hipocloroso para las cepas en estudio. Para el caso de *Escherichia coli* el coeficiente de dilución fue de 0,2; mientras que para *Listeria innocua* el coeficiente de dilución fue de 0,3. Ambos valores indicaron que el efecto biocida del Ácido Hipocloroso depende más del tiempo de acción que de la concentración del desinfectante.
- Se determinó el efecto germicida *in vitro* y el coeficiente de dilución del Ácido Hipocloroso, frente a cepas de *Listeria innocua* y *Escherichia coli*. Con los valores obtenidos, se puede dar por aceptada la hipótesis de este estudio, la cual indica que el Ácido Hipocloroso en la concentración y tiempo recomendados por el fabricante, disminuye o elimina la carga microbiana frecuentemente presente en la industria alimentaria.

X. Bibliografía

Almonte, Juan José. “Efecto bactericida de un yodóforo en superficies de acero inoxidable”. Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 2019.

Arriagada, Tamara. “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. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. 2016

Atarés, L. 2009. Problemas básicos de Cinética Química: ley de Arrhenius. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos.

Barbisan, C. R. Definición de Ecuación de Arrhenius. Definición ABC. [En Línea] <<https://www.definicionabc.com/general/ecuacion-arrhenius.php>> [Consulta: febrero 2023]

Betelgeux. Desinfectantes utilizados en la industria alimentaria: características, modo de actuación y aspectos que inciden en su eficacia. [En línea] <http://www.betelgeux.es/images/files/Documentos/Articulo_boletin_Desinfectantes_y_Modo_de_accion_en_IIAA.pdf> [Consulta: octubre, 2017]

Beuchat L. Pathogenic microorganisms associated with fresh produces. 1996. J. Food Prot., 59: 204-216.

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.

Castillo, D., Castillo, Y., Delgadillo, A., Lafaurie, G. 2015. Viability and effects on Bacterial Proteins by oral rinses with Hypochlorous Acid Active Ingredients. Brazilian Dental Journal 26, 519-524.

Cerra, H., Fernández, M., Horak, C., Lagomarsino, M., Torno, G., Zarankin, E. 2003. Manual de Microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de

productos medicos. Asociación Argentina de Microbiología. División de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, 45.

Cevallos, Rosa. "Investigación y desarrollo del bioasepsia a base de ácido hipocloroso en los procesos de desinfección". Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. 2014.

Coronado, S., Henao, D., Londoño, Á., Hernuzo, R. 2011. Efecto microbactericida del ácido hipocloroso en tres especies ambientales potencialmente patógenos y en *Mycobacterium tuberculosis*. *Infectio*, 15. 243-252.

CNTA. Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria. Departamento de aguas y envases. Protocolo toma de muestras por personal externo: Aguas consumo y agua envasada. [Consulta: enero, 2023]

Givovich, Melissa. "Determinación del coeficiente de dilución de un desinfectante compuesto de amonio cuaternario frente a cepas de interés en productos alimenticios". Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. 2018

Hartnett, S., Cheeseman, M., at. col. 2017. Environmental Assessment for Food Contact Notification FCN 1811.

Herrera, Jennifer. "Efecto bactericida de desinfectantes sobre cepas de *Escherichia coli* y *Listeria innocua* en superficies de uso en la Industria Alimentaria". Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. 2016

ICB Ibérica. El ácido Hipocloroso. [En Línea] <<https://www.acido-hipocloroso.com/ciencia/>> [Consulta: enero 2023]

Kempo, G., Schneider, K. 2000. Validation of Thiosulfate for Neutralization of Acidified Sodium Chlorite in Microbiological Testing. Alcide Corporation. *Poultry Science* 79: 1857-1860.

Lafaurie, G.; Calderón, J.; Zaror, C.; Millán, L.; Castillo, D. 2015. Ácido Hipocloroso: una nueva alternativa como agente antimicrobiano y para la proliferación celular para uso en odontología. *Int. J. Odontostomat.*, 9(3):475-481.

López, L., Romero, J., Ureta, F. Acción germicida *in vitro* de productos desinfectantes de uso en la industria de alimentos. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. 2016

Marchand, Edgar. "Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consumo humano en Lima Metropolitana". Memoria para optar al título de Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología. Lima, Perú. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2002

Marriott, Norman. *Essentials of food sanitation*. United States of America. Chapman & Hall. 1997. 3p., 79p. Food Science Texts Series.

Muñoz-Castellanos, L., Borrego-Loya, A., Villalba-Bejarano, C., González-Escobedo, R., Orduño-Cruz, N., Villezcas-Villegas, G., Rodríguez-Roque, M., Avila-Quezada, G. 2021. EL cloro y su importancia en la inactivación de bacterias, ¿Puede inactivar virus? *Mexican Journal of Phytopanthyology* 39: 198-206p

Paredes, E. "Estudio comparativo del efecto antibacteriano del peróxido de hidrógeno al 3,18%, hipoclorito de sodio al 1,85% y ácido hipocloroso en concentraciones de 125ppm y 500ppm contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*, estudio *in-vitro*". Trabajo teórico de titulación previo a la obtención del título de Odontólogo General. Quito, Ecuador. Universidad Central del Ecuador. 2018.

Pérez López, J., Espigares, M. 1995. Desinfección del agua. Cloración. Estudio sanitario del agua, Universidad de Granada.

Rodriguez, M. Limpieza y desinfección de equipos y superficies ambientales en instituciones prestadoras de servicios de salud. Secretaría Distrital de Salud, Dirección de Salud Pública. Bogotá, 2011.

Solar, M. Monopersulfato de Potasio utilizado como biocida contra diferentes cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua* de colección. Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. 2008.

Velásquez, L. Evaluación de la inhibición de *Escherichia Coli* sp a partir del desinfectante obtenido por electrólisis de cloruro de sodio. Memoria para optar al título de Ingeniero Químico. Facultad de Ingenierías, departamento de ingeniería química, Fundación Universidad de América. 2018.

Villatoro, Walter. "Reestructuración al proceso de limpieza de las líneas de envasado, en una planta de alimentos". Trabajo de graduación del Ejército Profesional Supervisado (E.P.S), al conferírsele el título de Ingeniero Químico. Guatemala. Facultad de Ingeniería, Universidad San Carlos de Guatemala. 2008

Wildbrett, G. 2006. Limpieza y Desinfección en la industria alimentaria. Editorial Acribia S.A., España.

XI. Anexos

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

XI.I.I Escherichia coli

a) Tabla Anova simple

Resumen Estadístico para UFC/mL

Medio	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo
Control	3	8,86667E8	2,50067E8	28,203%	6,E8
Neutralizante	3	1,03E9	9,27739E8	90,0718%	0
Neutralizante + Biocida	3	3,10667E9	3,38026E9	108,807%	9,2E8
Total	9	1,67444E9	2,06035E9	123,047%	0

Medio	Máximo	Rango	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
Control	1,06E9	4,6E8	-1,1459	
Neutralizante	1,8E9	1,8E9	-0,821715	
Neutralizante + Biocida	7,E9	6,08E9	1,19702	
Total	7,E9	7,E9	3,24212	4,61245

El StatAdvisor

Esta tabla muestra diferentes estadísticos de UFC/mL para cada uno de los 3 niveles de Medio. La intención principal del análisis de varianzas de un factor es la de comparar las medias de los diferentes niveles, enlistados aquí bajo la columna de Promedio. Selecciones Gráfica de Medias de la lista de Opciones Gráficas para mostrar gráficamente las medias.

b) Pruebas de Múltiple Rangos para UFC/mL por Medio

Método: 95,0 porcentaje LSD

Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	8,86667E8	X
Neutralizante	3	1,03E9	X
Neutralizante + Biocida	3	3,10667E9	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - Neutralizante		-1,43333E8	4,05355E9
Control - Neutralizante + Biocida		-2,22E9	4,05355E9
Neutralizante - Neutralizante + Biocida		-2,07667E9	4,05355E9

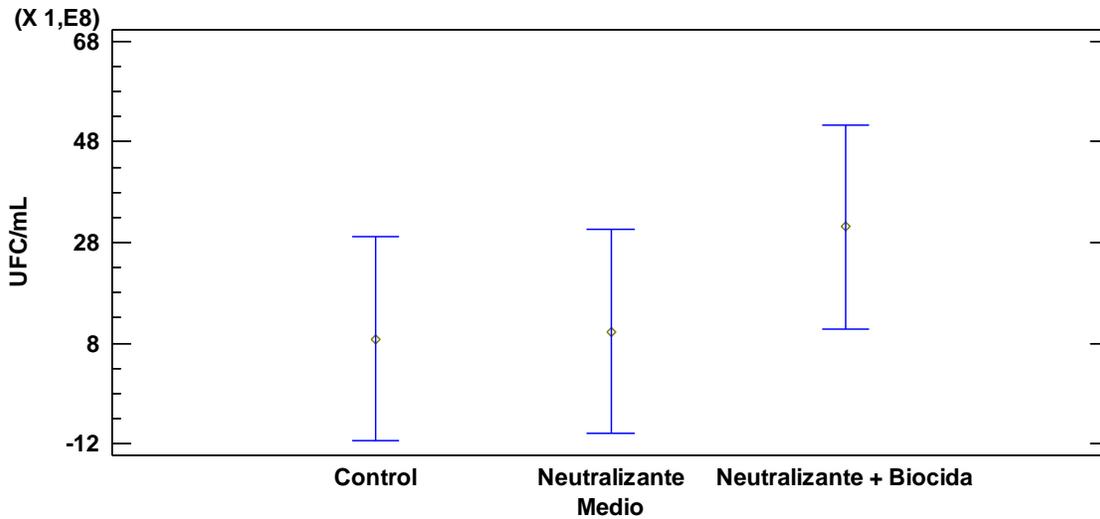
* indica una diferencia significativa.

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.

c) Gráfico de medias

Medias y 95,0% de Fisher LSD



XI.I.II Listeria innocua

a) Tabla Anova simple

Resumen Estadístico para UFC/mL

Medio	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo
Control	3	3,193E10	5,033E10	157,626%	8,9E8
Neutralizante	3	6,23333E8	6,0136E8	96,4748%	0
Neutralizante + Biocida	3	4,8E8	4,2332E8	88,1917%	0
Total	9	1,10111E10	2,96575E10	269,342%	0

Medio	Máximo	Rango	Sesgo Estandarizado	Curtosis Estandarizada
Control	9,E10	8,911E10	1,216	
Neutralizante	1,2E9	1,2E9	-0,245441	
Neutralizante + Biocida	8,E8	8,E8	-1,03086	
Total	9,E10	9,E10	3,65711	5,47211

El StatAdvisor

Esta tabla muestra diferentes estadísticos de UFC/mL para cada uno de los 3 niveles de Medio. La intención principal del análisis de varianza de un factor es la de comparar las medias de los diferentes niveles, enlistados aquí bajo la columna de Promedio. Selecciones Gráfica de Medias de la lista de Opciones Gráficas para mostrar gráficamente las medias.

b) Pruebas de Múltiple Rangos para UFC/mL por Medio

Método: 95,0 porcentaje LSD

Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Neutralizante + Biocida	3	4,8E8	X
Neutralizante	3	6,23333E8	X
Control	3	3,193E10	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Control - Neutralizante		3,13067E10	5,80613E10
Control - Neutralizante + Biocida		3,145E10	5,80613E10
Neutralizante - Neutralizante + Biocida		1,43333E8	5,80613E10

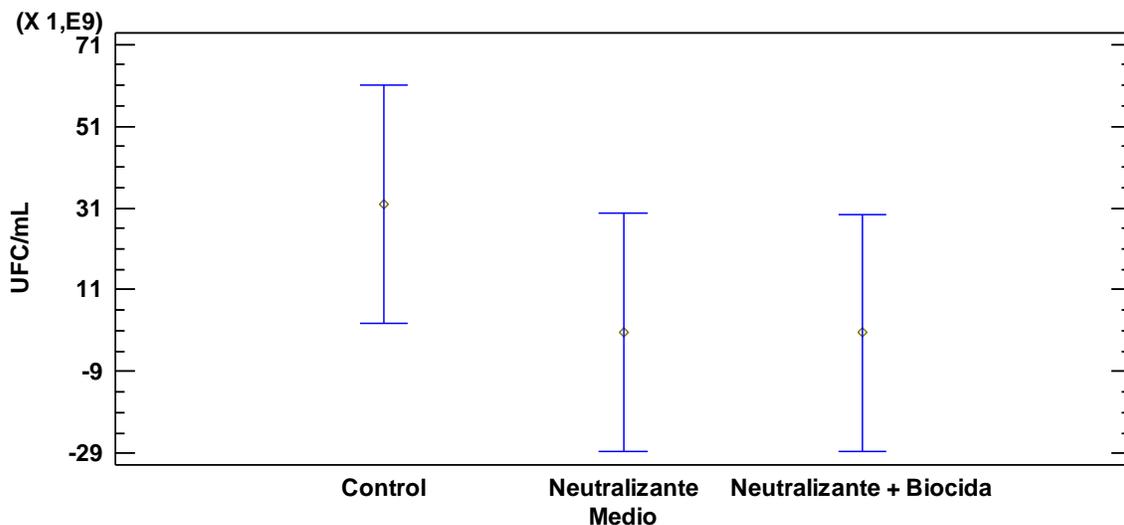
* indica una diferencia significativa.

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.

c) Gráfico de medias

Medias y 95,0% de Fisher LSD



XI.II Análisis de varianza multifactorial para determinar la acción germicida.

XI.III. Escherichia coli

a) Tabla Anova multifactorial

Análisis de Varianza para Log N - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración (ppm)	2,535	2	1,2675	1,84	0,2385
B:Tiempo de acción (min.)	67,3492	3	22,4497	32,55	0,0004
RESIDUOS	4,13833	6	0,689722		
TOTAL (CORREGIDO)	74,0225	11			

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

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Log N 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 N con un 95,0% de nivel de confianza.

b) Pruebas de Múltiple Rangos para Log N por Concentración (ppm) del desinfectante

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración (ppm)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3360	4	2,5	0,415248	X
2350	4	3,1	0,415248	X
1470	4	3,625	0,415248	X

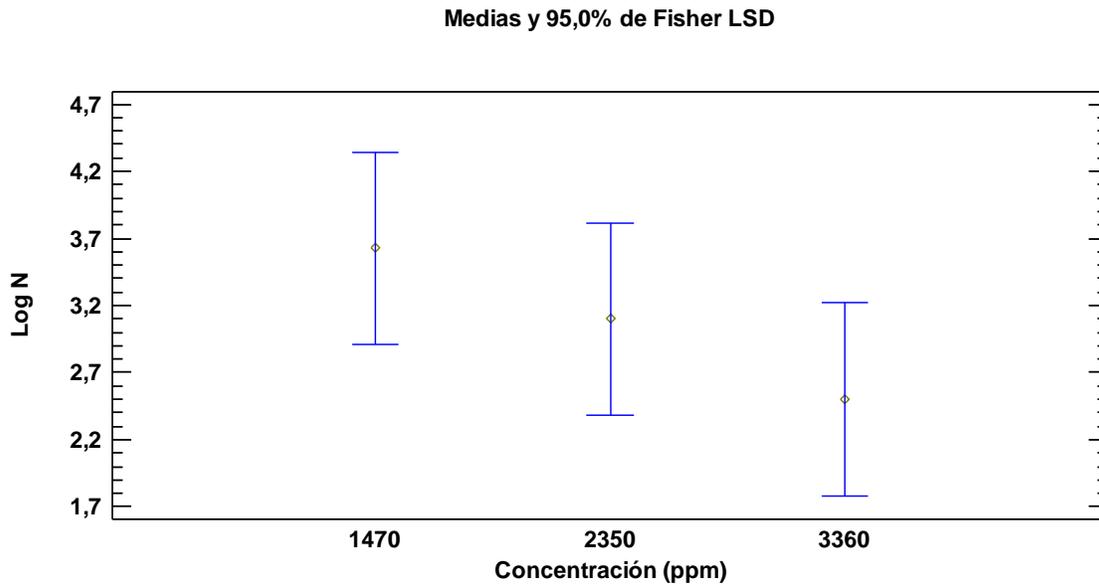
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1470 - 2350		0,525	1,43695
1470 - 3360		1,125	1,43695
2350 - 3360		0,6	1,43695

* 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.

c) Gráfico de medias



d) Pruebas de Múltiple Rangos para Log N por Tiempo de acción (min.)

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tiempo de acción (min.)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10	3	1,0	0,479487	X
5	3	1,43333	0,479487	XX
2	3	2,86667	0,479487	X
0	3	7,0	0,479487	X

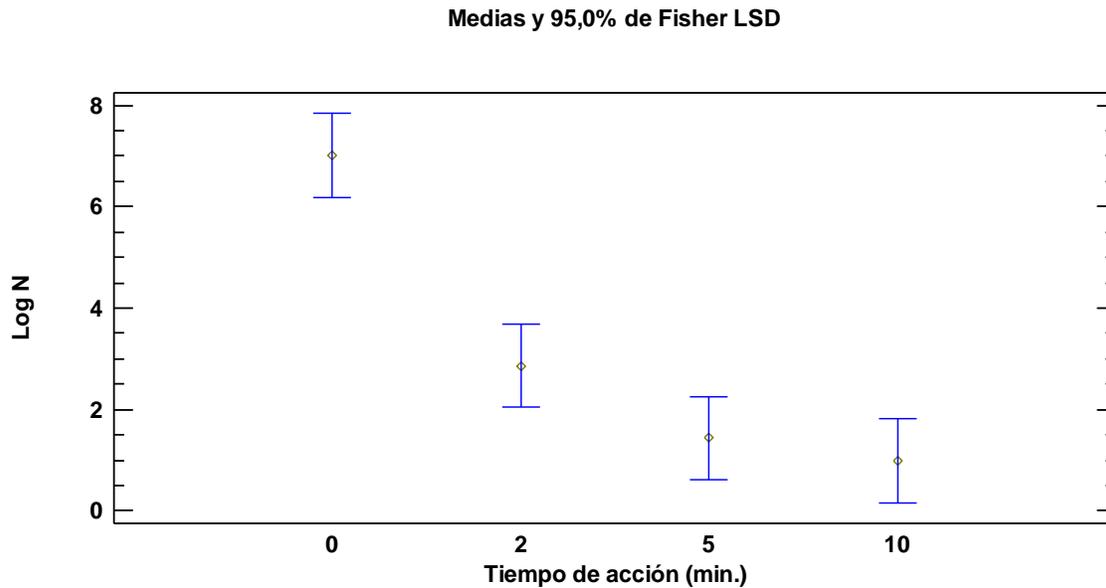
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 2	*	4,13333	1,65925
0 - 5	*	5,56667	1,65925
0 - 10	*	6,0	1,65925
2 - 5		1,43333	1,65925
2 - 10	*	1,86667	1,65925
5 - 10		0,433333	1,65925

* 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 4 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 3 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.

e) Gráfico de medias para Log N por Tiempo de acción (min.)



XI.III.II Listeria innocua

a) Tabla Anova multifactorial

Análisis de Varianza para Log N - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración (ppm)	4,68167	2	2,34083	2,28	0,1831
B:Tiempo de acción (min.)	68,1758	3	22,7253	22,16	0,0012
RESIDUOS	6,15167	6	1,02528		
TOTAL (CORREGIDO)	79,0092	11			

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

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Log N 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 N con un 95,0% de nivel de confianza.

b) Pruebas de Múltiple Rangos para Log N por Concentración (ppm) del desinfectante

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración (ppm)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2350	4	2,5	0,50628	X
3360	4	2,5	0,50628	X
1470	4	3,825	0,50628	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1470 - 2350		1,325	1,75196
1470 - 3360		1,325	1,75196
2350 - 3360		0	1,75196

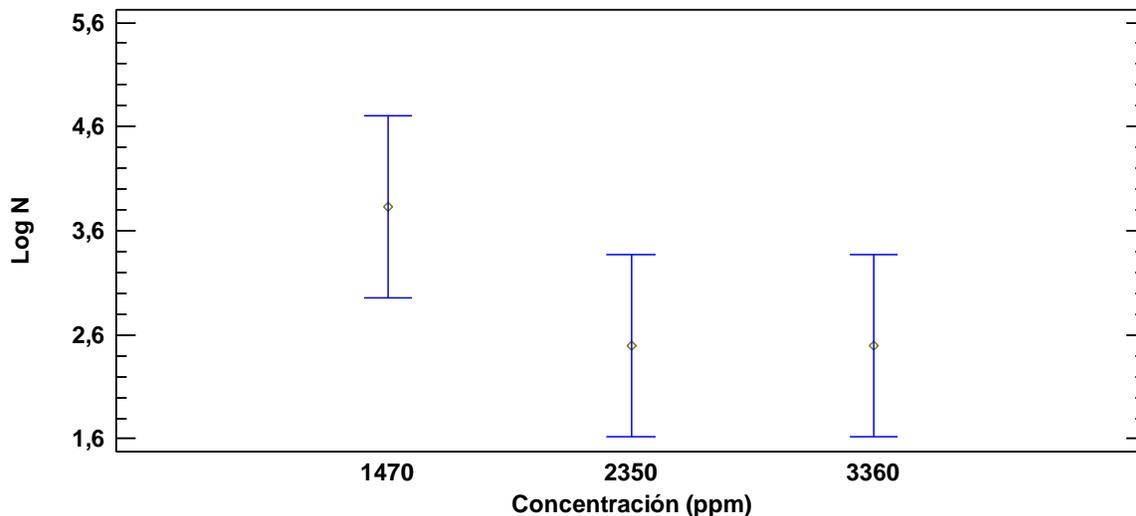
* indica una diferencia significativa.

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 comparten 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.

c) Gráfico de medias para Log N por Concentración (ppm) del desinfectante

Medias y 95,0% de Fisher LSD



d) Pruebas de Múltiple Rangos para Log N por Tiempo de acción (min.)

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tiempo de acción (min.)	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
10	3	1,0	0,584602	X
5	3	1,53333	0,584602	X
2	3	2,23333	0,584602	X
0	3	7,0	0,584602	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 2	*	4,76667	2,02299
0 - 5	*	5,46667	2,02299
0 - 10	*	6,0	2,02299
2 - 5		0,7	2,02299
2 - 10		1,23333	2,02299
5 - 10		0,533333	2,02299

* 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.

e) Gráfico de medias para Log N por Tiempo de acción (min.)

Medias y 95,0% de Fisher LSD

