

**EVALUACION DE LA EFECTIVIDAD DE LOS DESINFECTANTES DIVOSAN
FORTE Y MH EN LA DESINFECCION DE EQUIPOS Y AREAS DE TRABAJO EN
UNA EMPRESA PROCESADORA DE HELADOS**

Jimmy Andrés Troya Chavarriaga

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar por el título de**

Microbiólogo Industrial

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
Bogotá
Enero de 2007**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de junio de 1946

“La Universidad no se hace responsable
por los conceptos emitidos por sus alumnos
en sus trabajos de tesis.

Solo velará por que
no se publique nada contrario al dogma
y a la moral católica
y por que las tesis no contengan
ataques personales contra persona alguna,
antes bien se vea en ellas el anhelo
de buscar la verdad y la justicia”.

**EVALUACION DE LA EFECTIVIDAD DE LOS DESINFECTANTES DIVOSAN
FORTE Y MH EN LA DESINFECCION DE EQUIPOS Y AREAS DE TRABAJO EN
UNA EMPRESA PROCESADORA DE HELADOS**

Jimmy Andrés Troya Chavarriaga

APROBADO

JANETH ARIAS

Director

CINDY MARLENE FERNANDEZ LOPEZ

Microbióloga Industrial

TERESA LOPEZ

Bacteriologa MBa

**EVALUACION DE LA EFECTIVIDAD DE LOS DESINFECTANTES DIVOSAN
FORTE Y MH EN LA DESINFECCION DE EQUIPOS Y AREAS DE TRABAJO EN
UNA EMPRESA PROCESADORA DE HELADOS**

Jimmy Andrés Troya Chavarriaga

APROBADO

**Dra. ANGELA UMAÑA. M. Phil.
DECANO ACADEMICO**

**Dr. DAVID GOMEZ M. cS
DIRECTOR DE CARRERA**

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo de Grado, el cual representa uno de mis primeros y grandes triunfos en mi vida esta dedicado principalmente a mi familia en especial a Claudia Chavarriaga, mi Mama, porque sin su fortaleza y apoyo durante estos años, esto no había podido ser posible.

A Dios por haberme dado la fuerza y la paciencia para seguir adelante y no desistir de todo.

A Janeth Arias, ya que siempre confió en mí, me ofreció su apoyo, su tiempo y dedicación, cuando más lo necesitaba y siempre fue más que una docente.

Por último dedico este logro a mis amigos y compañeros, en especial a Candrea, por que siempre estuvieron allí, dándome una mano en el estudio o un consejo para la vida y la ilusión de cumplir este sueño.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

SUMMARY

	Pág.
1. INTRODUCCION.....	5
2. MARCO TEORICO.....	6
2.1 DESINFECTANTES.....	6
2.2 MECANISMO DE ACCION DE LOS DESINFECTANTES.....	8
2.2.1. Membrana externa.....	8
2.2.2. Membrana citoplasmática.....	9
2.2.3. Metabolismo energético.....	10
2.2.4. Citoplasma y Núcleo.....	10
2.2.5 Esporos Bacterianos.....	10
2.2.6. Inhibición de la acción enzimática.....	11
2.2.7. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.....	11
2.3. CLASIFICACION DE LOS DESINFECTANTES.....	12
2.3.1. Ácidos y Alcalis.....	12
2.3.2. Compuestos de cloro.....	12
2.3.3. Compuestos de amonio cuaternario.....	13
2.3.4. Yodóforos.....	14
2.3.4 AGENTES QUE DAÑAN LA MEMBRANA CELULAR.....	16
2.3.4.1 Detergentes (desinfectantes tensoactivos o surfactantes).....	16
2.3.4.1.1 Detergentes catiónicos.....	16
2.3.4.1.2 Detergentes aniónicos.....	17
2.3.4.1.3 Detergentes no iónicos.....	18
2.3.4.2. Fenoles.....	18
2.3.4.2.1. Fenol.....	18
2.3.4.2.2. Cresoles.....	19

2.3.4.2.3. Difenilos halogenados.....	19
2.3.4.2.4. Alquilésteres del para-hidroxibenzoico.....	19
2.3.4.3. Alcoholes.....	20
2.3.4.3.1. Etanol (CH ₃ -CH ₂ OH).....	21
2.3.4.3.2. Isopropanol	21
2.3.4.4 AGENTES DESNATURALIZANTES DE PROTEINAS.....	21
2.3.4.4.1 Ácidos orgánicos.....	21
2.3.4.5 PRODUCTOS DE ÁCIDO DE PERÓXIDO.....	22
2.4 METODOS PARA EVALUAR LOS DESINFECTANTES.....	22
2.4.1 COEFICIENTE FENOLICO.....	23
2.4.2 RECUENTO EN PLACA.....	23
2.4.3 FILTRACION POR MEMBRANA.....	23
2.4.4 TECNICA DE DILUCION EN TUBO.....	24
2.4.5 SUCEPTIBILIDAD MICROBIANA.....	24
3. JUSTIFICACION.....	25
4. OBJETIVOS.....	26
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1 Diseño de la investigación.....	27
5.1.1 Población de estudio y muestra.....	27
5.2.1 Variables de estudio.....	27
5.2.1.1 Variables dependientes.....	27
5.2.1.2 Variables independientes.....	28
5.3 Puntos de muestreo y obtención de la muestra.....	28
5.3.1 Diagrama de flujo: Obtención de la muestra.....	29
5.4 Preparación de soluciones a evaluar.....	30
5.5 Evaluación de actividad microbicida de desinfectantes.....	30
5.5.1 Diagrama de flujo: Evaluación de actividad microbicida de los desinfectantes.....	32

5.6 Control del área de siembra.....	33
5.7ANALISIS DE LA INFORMACION.....	33
6. RESULTADOS Y DISCUSION.....	34
6.1 Obtención de la muestra.....	34
6.2 Preparación de la muestra de desinfectantes y su evaluación.....	36
6.3 Evaluación de los desinfectantes.....	37
6.4 Evaluación <i>in vivo</i> de los desinfectantes.....	39
7. CRONOGRAMA DE TRABAJO.....	43
8. PRESUPUESTO.....	43
9. CONCLUSIONES.....	44
10. RECOMENDACIONES.....	45
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	46
12. ANEXOS.....	49

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Porcentajes de los microorganismos encontrados.....	35
TABLA 2. Eficacia de los desinfectantes en la concentración recomendada (0.2% V/V).....	37
TABLA 3.Eficacia de los desinfectantes en la concentración 0.1% v/v.....	38
TABLA 4.Eficacia de los desinfectantes en la concentración 0.4% v/v.....	39
TABLA 5.Eficacia de los desinfectantes en la concentración 0.2% v/v. Prueba <i>in vivo</i>	40

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Coloración Bacilos Gram negativos.....	36
FIGURA 2. Morfología de colonias con mayor incidencia.....	36
FIGURA 3. Porcentajes de inhibición al 0.2% v/v.....	38
FIGURA 4. Porcentajes de inhibición al 0.1% v/v.....	38
FIGURA 5. Porcentajes de inhibición al 0.4% v/v.....	39
FIGURA 6. Porcentajes de inhibición al 0.2% v/v. Prueba <i>in vivo</i>.....	40

RESUMEN

Nuestro trabajo surgió por la necesidad de conocer la efectividad de los desinfectantes DIVOSAN FORTE Y MH, utilizados para la desinfección tanto en las áreas de trabajo como en la maquinaria, de una industria procesadora de helados. Para este procedimiento se utilizó la técnica de siembra en estría sobre agár selectivo para los diferentes microorganismos que se encontraron con mayor incidencia dentro de la planta procesadora de helados.

En la evaluación de los desinfectantes se tuvieron en cuenta tres diferentes concentraciones de los mismos, la recomendada por la casa comercial 0.2% v/v, el doble de la recomendada 0.4% v/v y la mitad de la recomendada 0.1% v/v. Se realizaron pruebas en tres tiempos distintos a los 5, 10, y 15 minutos, para así determinar el mejor tiempo de acción de los desinfectantes.

Los resultados que arrojaron estas pruebas mostraron que estos dos tipos de desinfectantes resultaron muy efectivos con los microorganismos que se evaluaron, ya que revelaron un 100% de inhibición en el crecimiento de estos, tanto en la concentración recomendada 0.2% v/v, como en la correspondiente al doble de esta es decir 0.4% v/v. En cuanto a la concentración correspondiente a la mitad de la recomendada, en este caso 0.1% v/v, se observó que presenta fallas en su efectividad, debido a que a los 5 minutos de exposición, el porcentaje de inhibición fue de 0%, y a los 10 minutos fue de 75%, lo cual indica que a esta concentración, los desinfectantes necesitan un mayor tiempo de exposición, el cual esta entre 10 y 15 minutos, para lograr un 100% de inhibición del crecimiento microbiano.

Para la prueba *in vivo* que se llevó a cabo, los desinfectantes mostraron una efectividad del 100% en la concentración recomendada 0.2% v/v, para los diferentes tiempos en que se evaluaron 5, 10, y 15 minutos, inhibiendo así los microorganismos presentes en las áreas de trabajo y maquinas utilizadas.

SUMMARY

Our work came up by the necessity to know the effectiveness of the disinfectants DIVOSAN FORTE and MH, used to disinfect the work areas and the machinery of an ice cream processing plant, were evaluated. For this procedure, the sowing in groove on selective agar technique was used for the different microorganisms that were found with greatest frequency inside the ice cream processing plant.

In the evaluation of the disinfectants, three different concentrations were utilized: the amount recommended by the commercial company 0.2% v/v, twice the recommended amount 0.4% v/v, and half the recommended amount 0.1% v/v. Tests were conducted at three different times, 5, 10 and 15 minutes, to determine the best action time of the disinfectants.

The results from these tests demonstrated that these two types of disinfectants proved very effective with the microorganisms that were evaluated, because there was a 100% growth inhibition when the recommended amount of 0.2% v/v was used, as well as when twice the recommended amount of 0.4% v/v was used. When half the recommended amount was used, 0.1% v/v, the following flaws were observed in its effectiveness: after 5 minutes of exposure, the percentage of inhibition growth was 0% and after 10 minutes of exposure, the percentage of inhibition growth was 75%. This indicates that at 0.1% v/v concentration, the disinfectants need more exposure time, between 10 and 15 minutes, to reach 100% microbe growth inhibition.

For the *in vivo* test that was performed, the disinfectants demonstrated 100% effectiveness at the recommended concentration of 0.2% v/v for each of the three times they were evaluated (5, 10 and 15 minutes) inhibiting the microorganisms present in the work areas and on the utilized machinery.

1. INTRODUCCION

Los procesos de limpieza y desinfección en la industria de alimentos, son elementos cruciales dentro de la fabricación de diferentes productos, que el consumidor puede llegar a encontrar en el mercado, debido a que este tipo de procesos disminuye la carga microbiana que se encuentra en el ambiente y asegura una mayor calidad en el producto terminado, generando un valor agregado. Además las operaciones de limpieza y desinfección que se llevan a cabo en industrias, hospitales y toda clase de laboratorios influyen directamente sobre el control de calidad de los procesos realizados en tales lugares.

Por tal razón es de suma importancia tener en cuenta la correcta utilización de las sustancias destinadas para este proceso, ya que con el exceso o el uso indebido de estas, no podremos asegurar la calidad dentro de nuestro proceso de desinfección y generaremos una ineficacia a largo plazo, debido que los microorganismos pueden ir adquiriendo resistencia a los productos utilizados en dicho proceso.

Todo esto ha venido tomando mucho auge en las últimas décadas, debido a que los estándares de calidad requeridos para la comercialización de un producto en el sector alimenticio cada vez son más estrictos y exigentes, a su vez debemos tener en cuenta que las sustancias utilizadas para el proceso tengan una tasa de efectividad alta y no generen un costo excesivo para la empresa.

La desinfección es un proceso que exige un riguroso y fuerte control dentro de cada una de las industrias alimenticias para obtener una higiene total en los productos.

Es así, como este trabajo pretende evaluar la efectividad de los desinfectantes DIVOSAN FORTE Y MH en la desinfección de equipos y áreas de trabajo de una industria procesadora de alimentos.

2. MARCO TEORICO

2.1 DESINFECTANTES

Los desinfectantes, son sustancias químicas que tienen como fin disminuir o eliminar el número de microorganismos que se encuentran en áreas que pueden entrar en contacto con los alimentos. Los procesos de desinfección, por su parte, pueden llegar a ser mas efectivos si se lleva a cabo una limpieza completa del equipo o de la superficie que se va a desinfectar, debido a que la materia orgánica que puede estar presente, es capaz de reducir la capacidad biocida de los desinfectantes, debido a su efecto diluyente (Marriott, 2003). Para lograr una buena limpieza y desinfección en las instalaciones es necesario conocer las diferentes formas de contaminación para que de esta manera se pueda implementar un sistema de control y prevención adecuado (Guevara, 1999).

Los desinfectantes deben seleccionarse teniendo en cuenta el tipo de microorganismo que se desea eliminar, el tipo de producto que se elabora y el material de las superficies que entran en contacto con el producto utilizado (Ascenzi. L, 1996).

Por otra parte, los desinfectantes varían en su composición química y actividad, por esto, existen en el mercado productos con mayor concentración, lo que asegura una rápida y eficaz acción. Además del tipo de condiciones a nivel de su composición, se deben tener en cuenta diferentes factores físico-químicos que en algún momento pueden llegar a afectar la eficacia de los desinfectantes, como lo son:

- Tiempo de exposición: La carga microbiana y la diversa sensibilidad de la población bacteriana al desinfectante, debido a la edad, formación de esporas y otros factores fisiológicos determinan el tiempo requerido para que el desinfectante sea eficaz.
- Temperatura: Aumentar la temperatura favorece la velocidad de destrucción de los microorganismos.

- pH: La actividad de los desinfectantes tiene lugar dentro de una zona concreta de pH, por lo que dicha actividad puede verse influida por cambios relativamente pequeños de pH.
- Limpieza del Equipo: algunos compuestos clorados, yodados y otro tipo de desinfectantes pueden reaccionar con los compuestos orgánicos de la suciedad que no hayan sido eliminados, ya que una limpieza deficiente puede reducir la eficacia de un desinfectante.
- Dureza del Agua: Los compuestos de amonio cuaternario son incompatibles con sales de calcio y magnesio, por lo que no deben usarse en combinación con aguas duras. A medida que aumenta la dureza del agua, decrece la eficacia de estos desinfectantes.
- Adherencia Bacteriana: La adherencia de ciertos microorganismos a ciertas superficies sólidas supone una mayor resistencia al cloro (Marriott, 2003).

Es importante considerar además, ciertos parámetros que se deben tener en cuenta y las condiciones necesarias que debe cumplir un desinfectante, que va a ser utilizado en la industria procesadora de alimentos:

- Destruir rápidamente los microorganismos, siendo igual de eficaces con las bacterias Gram positivas que con las Gram negativas. Deben destruir la mayoría de las esporas fúngicas, siendo también conveniente la destrucción de las esporas bacterianas.
- Ser suficientemente estables en presencia de residuos orgánicos y si fuera necesario, en presencia de aguas duras.
- No ser corrosivos ni dar color a ninguna superficie.
- Ser inodoros o no desprender olores desagradables.

- No ser tóxicos, ni irritantes a los ojos o a la piel.
- Fácilmente solubles en agua y arrastrables por enjuagado.
- Deben ser estables durante mucho tiempo en forma concentrada y durante menor tiempo en formas diluidas.
- Económicamente competitivos y al emplearlos presentar una buena relación costo/efectividad (Forsythe y Hayes, 2002).

2.2 MECANISMO DE ACCION DE LOS DESINFECTANTES

Para asegurar el buen rendimiento de los desinfectantes utilizados en la industria de alimentos, además de conocer las condiciones físico-químicas óptimas, es necesario conocer la forma de acción que este tipo de sustancias tienen para reaccionar con las proteínas y las enzimas esenciales de los microorganismos. La actuación de las sustancias químicas con acción desinfectante, se centra por lo general en algún punto concreto de la estructura de los microorganismos o ejercen su acción sobre algún mecanismo vital. Se seleccionan, por lo general, productos con actividad selectiva (que producen daño al microorganismo patógeno), así pueden considerarse los siguientes blancos celulares: (Rojas, 2001).

2.2.1. Membrana externa:

La membrana externa protege la integridad de la bacteria y es por lo tanto esencial para su supervivencia. En su composición se incluyen fosfolípidos y lipopolisacáridos estabilizados mediante cationes de Mg^{++} y Ca^{++} . Hay además, proteínas y otros compuestos mas o menos complejos según el tipo de microorganismo que se considere. De este modo, según las moléculas del desinfectante ionizado sean absorbidas o repelidas por la carga eléctrica en el contacto inicial, puede suceder que: (Rojas, 2001)

- Las moléculas no polares penetren en el interior y disuelvan la fase lipídica de la bacteria
- Como consecuencia de la carga eléctrica sean repelidos, actuando sistemas como transporte específico que conducen y que transportan el desinfectante a través de la membrana.
- Otros casos están representados por moléculas capaces de perturbar la organización de la membrana mediante el establecimiento de puentes con determinados puntos de la estructura.
- La pared bacteriana, compuesta por peptidoglicano o peptidoglicano LPS, es importante, pues confiere rigidez y forma, siendo causa de la diferencia fundamental de los microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Esta diversidad conduce a una gran variación en las afinidades de los desinfectantes hidrofílicos. Los aldehídos, por ejemplo, interaccionan con los grupos $-NH_2$ de las proteínas y aminoácidos (Franklin, 1989).

2.2.2. Membrana citoplasmática:

Una molécula activa puede penetrar a través de la membrana citoplasmática por difusión pasiva o mediante transporte activo (que es un procedimiento específico, capaz de permitir la acumulación de productos en la bacteria o el traslado se produce con el producto transformado o unido a una proteína de membrana). Los desinfectantes más utilizados, incluyendo fenoles, derivados de amonio cuaternario, biguanidas entre otros, producen fisuras a nivel de compuestos de bajo peso molecular, siendo causa de desnaturalización proteica y lisis celular. Los derivados de amonio cuaternario interaccionan con los fosfolípidos de la membrana y producen daño celular generalizado (Rojas, 2001).

2.2.3. Metabolismo energético:

Algunos desinfectantes actúan sobre la producción de ATP. Desde hace ya muchos años se conoce que algunos agentes pueden desequilibrar la fosforilación oxidativa. Estos agentes inhiben la síntesis de ATP de forma distinta a como lo hacen los inhibidores de la ATPasa. Entre ellos pueden citarse por ejemplo el 2,4, dinitrofenol (DPN), y la tetracloresalicilanilida (TCS), que son solubles en lípidos, se disuelven en las membranas biológicas desasociando oxidación de fosforilación, el suministro energético y causando un bloqueo del flujo de protones al interior de la célula, colapsando con ello su metabolismo (Deel, 1998; Franklin, 1989).

2.2.4. Citoplasma y Núcleo:

Algunos productos desinfectantes interfieren a nivel de enzimas o proteínas, rompiendo los grupos –SH, de las primeras, que pueden estar asociados a las membranas. Otros productos se combinan con el ADN o el ARN, como sucede con los agentes alquilantes y oxidantes (Deel, 1998).

2.2.5 Esporos Bacterianos:

La presencia de ácido dipicolínico hace a estas formas más resistentes a los desinfectantes que las formas vegetativas. Algunos desinfectantes activos, oxidantes como el peróxido de hidrógeno y el cloro, son capaces de desestabilizar este compuesto en los esporos. Comparativamente, sin embargo, pocos desinfectantes químicos son esporicidas. Muchos bactericidas fuertes, como sucede en el caso de los fenoles o los derivados de amonio cuaternario, poseen sin embargo un escaso efecto sobre la viabilidad de los esporos bacterianos. No obstante, estos agentes pueden inhibir determinados estadios del ciclo esporogénico, por lo que pueden establecerse tres áreas sobre las cuales tiene lugar el efecto letal o inhibitorio: (Deel, 1998).

- Durante las fases de esporulación
- Sobre el espora maduro

- Durante la germinación y/o crecimiento (Deel, 1998).

2.2.6. Inhibición de la acción enzimática:

El sitio catalítico de una enzima contiene grupos funcionales que se unen con el sustrato e inician los procesos catalíticos. Se produce inhibición de la actividad enzimática si uno o más de estos grupos funcionales es alterado o destruido (Zinsser, 1994).

Cada uno de los cientos de enzimas que hay en una célula son un blanco potencial para un inhibidor. La disminución de las reacciones que suministran energía son particularmente dañinas; muchos agentes afectan enzimas que son vía clave como el sistema glucolítico, el ciclo de Krebs y el sistema citocromo oxidasa (Pelczar, 1994).

2.2.7. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos:

Existen sustancias químicas que son poderosos inhibidores de la síntesis de RNA y DNA. Hay dos maneras de inhibir la síntesis de estos ácidos: a) Interfiriendo la formación de los bloques estructurales de los ácidos nucleicos, los nucleótidos purina y pirimidina. b) Interfiriendo con la polimerización de los nucleótidos (Pelczar, 1994).

El papel vital del RNA y DNA en los procesos normales de la vida de la célula señala que toda interferencia con su formación y su función ha de dañar irreparablemente la célula (Pelczar, 1994).

2.3. CLASIFICACION DE LOS DESINFECTANTES

Los desinfectantes se clasifican de acuerdo al agente que es el encargado de destruir a los microorganismos, hoy en día encontramos gran variedad de estos agentes, los cuales poseen espectros de acción y propiedades diferentes. Debido a lo anterior encontramos los siguientes grupos:

2.3.1. Ácidos y Alcalis:

Las soluciones acidas o alcalinas son altamente bactericidas. Los ácidos orgánicos débiles ejercen un efecto mayor del que sería explicable por su pH: la presencia de moléculas altamente permeables y no disociadas promueven la penetración del ácido en la célula y la creciente actividad sugiere la existencia de una acción directa del mismo compuesto orgánico. Los ácidos controlan los depósitos minerales y son suavizantes del agua (Aldana-Sarassa, 1999).

Las bases alcalinas actúan por emulsificación, saponificación y peptinización. Con frecuencia a los limpiadores alcalinos se les agrega cloro (175-200 ppm) para aumentar la capacidad de peptinización, en estos casos el cloro no es considerado como desinfectante (Aldana-Sarassa, 1999).

2.3.2. Compuestos de cloro:

Son poderosos germicidas de amplio espectro de actividad, falta de residuos venenosos y de bajo precio. Como otros halógenos son muy reactivos con la materia orgánica y deben usarse sobre superficies limpias o en concentraciones elevadas. (Bidou, 1977).

El efecto bactericida se fundamenta en la capacidad oxidante del cloro en forma de $2Cl^{\cdot}$. Un mol de $Ca(OCl_2)$ y de $NaOCl$ respectivamente libera 141 y 74.5 moles de Cl^{\cdot} . También se ha demostrado su capacidad para producir cambios en la permeabilidad de la membrana celular. La acción bactericida del cloro disminuye a medida que aumenta el pH y aumenta con la temperatura de la solución desinfectante que pierde actividad en presencia de materia orgánica (Aldana-Sarassa, 1999).

Los compuestos que liberan cloro son sensibles tanto para las bacterias Gram negativas como para las Gram positivas; además estos compuestos presentan cierta actividad frente a las esporas bacterianas. Los compuestos que liberan cloro son fáciles de usar y no se ven afectados por las aguas duras. El inconveniente de estos agentes es que se inactivan rápidamente en presencia de materia orgánica, y además deben jugarse muy bien para evitar corrosión (Forsythe y Hayes, 2002).

El ácido hipocloroso, el más activo de los compuestos clorados, parece que mata la célula microbiana impidiendo la oxidación de la glucosa, oxidando con el cloro los grupos sulfhidrilos de ciertas enzimas importantes en el metabolismo hidrocarburoso. Se ha considerado la aldosa como principal punto de acción, debido a su carácter esencial en el metabolismo (Marriott, 2003).

Las fuentes de cloro más utilizadas son el hipoclorito de sodio, que libera un 12% a 14% de cloro y el hipoclorito de calcio con un 65% de disponibilidad. Debido a que el blanqueador doméstico hipoclorito de sodio no genera residuos tóxicos es un excelente desinfectante en laboratorios para las incubadoras, mesas de trabajo entre otros (Aldana-Sarassa, 1999).

2.3.3. Compuestos de amonio cuaternario:

Los compuestos de amonio cuaternario, conocidos como QACs son esencialmente sales de amonio con algunos o con todos los átomos de ión $(\text{NH}_4)^+$ sustituido por grupos alquilo o arilo. Los QACs más utilizados son el bromuro de cetiltrimetilamonio y el cloruro de laurildimetilbenzil-amonio (Forsythe y Hayes, 2002).

Estos desinfectantes son muy activos frente a bacterias Gram positivas, siendo menos eficaces frente a las Gram negativas, las esporas bacterianas son relativamente resistentes, si bien previenen su desarrollo. Las superficies después de desinfectadas con QACs, presentan una película bacteriostática debido a la absorción del desinfectante en la superficie, esta película evita el crecimiento de las

bacterias residuales y además mantienen su actividad en un amplio rango de pH, si bien donde son mas activos es en condiciones alcalinas débiles, su poder disminuye rápidamente cuando el pH es menor de cinco. Otro problema que puede presentar este tipo de productos es que el agua disminuye su actividad. (Aldana-Sarassa.1999; Marriott, 2003).

Algunas de las ventajas que poseen los QACs es que se ven poco afectados por la presencia de restos orgánicos, no son corrosivos ni irritan la piel, por esto pueden manipularse con bastante seguridad (Forsythe y Hayes, 2002), tienen buena capacidad de penetración y actúan como agentes humectantes con propiedades detergentes adicionales, por esto son considerados como surfactantes sintéticos (Marriott, 2003).

El mecanismo de la acción germicida no se conoce enteramente pero puede ser que la naturaleza surfactante de QAC envuelva y cubra la membrana exterior del microorganismo, con el siguiente trastorno funcional de la pared y subsiguiente salida de corpúsculos internos e inhibición enzimática. Los QAC no matan esporas bacteriana, pero inhiben su crecimiento (Marriott, 2003).

2.3.4. Yodóforos

Los Yodóforos son mezclas solubles de yodo con un surfactante (típicamente no iónico, si bien pueden emplearse también los aniónicos y los catiónicos) que actúa como transportador del elemento que presenta el poder bactericida: el yodo. Los Yodóforos pueden ser considerados, por lo tanto, como detergentes – desinfectantes, aunque el poder detergente depende de la cantidad de surfactante de la mezcla. Cuando se utilizan los Yodóforos como desinfectantes, se adiciona justo la cantidad de surfactante necesaria para disolver y estabilizar el yodo, pero cuando se emplean como detergentes – desinfectantes debe añadirse más surfactante para mejorar la detergencia. (Hayes, 1993)

Los Yodóforos destruyen rápidamente un amplio espectro de bacterias en lo cual se parecen a los hipocloritos, pero conservan también una actividad razonable en presencia de detritos orgánicos desde que el pH no sea mayor de 4 y la cantidad de aquellos no sea excesiva. Sin embargo, frente a las esporas los Yodóforos son menos activos que los hipocloritos. (Hayes, 2002)

Estos desinfectantes son caros y consecuentemente no se utilizan mucho, no son corrosivos, ni irritantes, ni tóxicos y tienen un ligero olor, pero hay que enjuagar bien después de su empleo. Algunos materiales plásticos absorben el yodo y se colorean al exponerlos a éstos compuestos; también la goma suele absorber el yodo, razón por la cual deben evitarse los contactos prolongados con esta clase de desinfectantes para prevenir la posible tinción de los alimentos. (Hayes, 2002)

Dentro de las ventajas de estos compuestos se encuentra el hecho de que no se ven afectados por las sales de las aguas duras y son estables en forma concentrada, aunque después de largos periodos de almacenamiento a temperaturas altas es posible una cierta pérdida de actividad. Se pueden trabajar con temperaturas de hasta 50°C y con concentraciones de yodo entre 10 y 100ppm. (Hayes, 2002)

Estos desinfectantes presentan diferentes mecanismos de acción sobre los microorganismos: (Guevara, 1997)

- Actúan sobre los aminoácidos y nucleótidos a nivel del puente N-H, formando iodoaminas con el correspondiente bloqueo del H⁺.
- Sobre los puentes S-H, ejerce un efecto oxidante impidiendo al síntesis de proteínas.
- Sobre los ácidos grasos forma uniones C=C que impiden su movilización a través de la membrana (Guevara, 1997).

2.3.4 AGENTES QUE DAÑAN LA MEMBRANA CELULAR

Los solventes orgánicos (fenoles, alcoholes) y los desinfectantes tensoactivos (detergentes) dañan la integridad estructural de la membrana (es decir, la disposición ordenada de lípidos y proteínas), de modo que interfieren con su función, ejerciendo un efecto neto de:

Interferencia con procesos de transporte y metabolismo energético;

Salida de pequeñas moléculas de la célula. (Hayes, 1993)

2.3.4.1 Detergentes (desinfectantes tensoactivos o surfactantes)

Los detergentes sintéticos, al igual que los jabones, contienen una porción hidrofóbica (normalmente una larga cadena lipófila) y una porción hidrófila (un grupo polar), lo cual les permite formar micelas en solución acuosa, así como formar capas que cubren y solubilizan moléculas hidrófobas.

Según sea la porción hidrófila, los detergentes se pueden clasificar en:

Detergentes iónicos

Detergentes catiónicos (grupo activo con carga positiva)

Detergentes aniónicos (grupo activo con carga negativa)

Detergentes no iónicos (no suelen tener actividad antimicrobiana) (Guevara, 1999).

2.3.4.1.1 Detergentes catiónicos

Son los detergentes más potentes en cuanto a su actividad desinfectante, siendo activos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Los principales son los llamados compuestos de amonio cuaternario. (Guevara, 1999).

Sales de amonio cuaternario, sobre todo aquellas que van como cloruros o bromuros. Su fórmula general se puede representar así:

Los cuatro sustituyentes (R1 a R4) del N son cadenas de hidrocarburos variados. Las sales de amonio cuaternario más activas son aquellas que tienen tres grupos

alquílicos cortos y un grupo alquílico largo: cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzalconio (Franklin, 1989).

Mecanismo de acción: La porción hidrófoba penetra en las membranas, mientras que el grupo polar catiónico se asocia con los fosfatos de los fosfolípidos, provocando alteraciones en dichas membranas, reflejadas en la pérdida de su semipermeabilidad, con salida de metabolitos de N y P desde el citosol. Es entonces cuando el detergente puede entrar al interior celular, con un efecto secundario de desnaturalización de proteínas. Su actividad se mejora a pH alcalino (Franklin, 1989).

Son rápidamente bactericidas a concentraciones muy bajas (del orden de una parte por millón, 1 ppm), siempre que en el material a tratar no exista materia orgánica.

Usos, ventajas e inconvenientes: Tienen baja toxicidad, por lo que se pueden emplear como desinfectantes y antisépticos de la piel. Se emplean igualmente en la desinfección de material de industrias alimentarias. Su actividad se ve neutralizada por jabones y fosfolípidos, precipitando en su presencia (Franklin, 1989).

2.3.4.1.2 Detergentes aniónicos

Con grupos carboxilo como porción hidrófila: (Iañez, 1998).

Jabones

Saponinas

Sales biliares

Ácidos grasos disociables

Con grupos sulfato como porción hidrófila:

Dodecilsulfato sódico (SDS), también llamado laurilsulfato sódico

Sulfonato de alquilbenceno

Mecanismo: Provocan una gran disrupción de membranas, con efectos de lisis. Son activos sobre todo a pH ácido, preferentemente sobre bacterias Gram-positivas,

pero poco sobre Gram-negativas, ya que éstas quedan más protegidas por la barrera del lipopolisacárido de la membrana externa.

Usos: Cuando los detergentes aniónicos se combinan con ácidos, se logran desinfectantes sanitarios muy potentes (debido al efecto sinérgico de ambos componentes) y de rápida actuación (unos 30 segundos) (Iañez, 1998).

2.3.4.1.3 Detergentes no iónicos

No tienen actividad antimicrobiana, pero algunos tienen empleo en otros campos de la Microbiología: los ésteres del ácido oleico (bajo nombres comerciales como CarbowaxJ, Tween-80J) pueden adicionarse a medios de cultivo para evitar la formación de grumos y favorecer el crecimiento disperso de ciertas bacterias (como *Mycobacterium tuberculosis*); además el oleico puede estimular el crecimiento (Iañez, 1998).

2.3.4.2. Fenoles

Son rápidamente bactericidas a bajas concentraciones, causando:

Daños a membranas, con pérdida de constituyentes citoplásmicos;

Inactivación irreversible de oxidasas y deshidrogenasas de membrana;

Desnaturalización de proteínas (Jeffrey, 1995).

Tienen baja solubilidad en agua, por lo que se emplean en fórmulas que incluyen agentes emulsificadores (jabones) que, además, aumentan su actividad (Jeffrey, 1995).

2.3.4.2.1. Fenol

El fenol o ácido carbólico, históricamente uno de los primeros desinfectantes en usarse, sólo se emplea en la actualidad como patrón para ensayar el poder desinfectante de otros compuestos (Jeffrey, 1995).

A partir del fenol se pueden lograr desinfectantes con mayor actividad antibacteriana y con menor toxicidad sustituyendo hidrógenos del anillo bencénico por radicales alquílicos o por halógenos. Hé aquí algunos ejemplos: (Jeffrey, 1995).

2.3.4.2.2. Cresoles

Son los alquil-fenoles. El radical alquílico puede estar en posición orto, meta o para, dando respectivamente el orto-cresol, el meta-cresol y el para-cresol. Normalmente se emplea la mezcla de los tres, denominada tricresol. Se obtienen por destilación del alquitrán de carbón, y se emplean como emulsiones de jabón verde bajo los nombres comerciales de LysolJ y CreolínJ. Se usan como desinfectantes de material de desecho bacteriológico y como desinfectantes de la piel (Paz, 1999).

2.3.4.2.3. Difenilos halogenados

El hexaclorofeno (hexacloro-orto-difenilmetano) es bacteriostático a bajas concentraciones (sobre todo contra cocos Gram-positivos), incluso incorporado en jabones, pasta de dientes y cosméticos (Paz, 1999).

Algunas marcas comerciales incluían hace unos años este compuesto, hasta que se comprobó que su absorción por la piel, sobre todo inflamada, puede causar neurotoxicidad e incluso, toxicidad sistémica, por lo que en la actualidad ha dejado de usarse (Paz, 1999).

2.3.4.2.4. Alquilésteres del para-hidroxibenzoico

Actúan de forma similar a los alquilfenoles, pero no son tóxicos, debido a que al ser ingeridos, se hidrolizan rápidamente, dando el inocuo para-hidroxibenzoato. Se emplean como conservantes de alimentos y de productos farmacéuticos.

Dentro de las ventajas y desventajas de los compuestos fenólicos se encuentran: (Arias, Cifuentes, Echeverry y Granados, 2005)

- **Ventajas**

- Presentan amplio espectro de actividad antimicrobiana: son desinfectantes efectivos contra bacterias vegetativas, incluyendo al *Mycobacterium tuberculosis*.
- Son fácilmente mezclables con aditivos.
- Se encuentran disponibles en múltiples formulaciones.
- Presentan una buena acción limpiadora.
- Son germicidas para acciones domésticas y sanitarias.

- **Desventajas**

- Son poco efectivos como esporicidas.
- Presentan olor desagradable.
- Irritan la piel y mucosa nasal
- Son tóxicos
- Se inactivan por la presencia de materia orgánica.
- Son incompatibles con otros materiales
- Son costosos.

Los fenoles inducen daños de constituyentes celulares, incluyendo la liberación de potasio como primer factor involucrado en el daño de la membrana. Poseen también actividad fungicida cuya acción probablemente involucra el daño de la membrana plasmática, lo que resulta en el daño de constituyentes celulares. (Arias, Cifuentes, Echeverry y Granados, 2005)

2.3.4.3. Alcoholes

Los alcoholes desorganizan las bicapas lipídicas penetrando en la región hidrocarbonada de los lípidos. No afectan a las endosporas, por lo que no son esterilizantes. Su acción desinfectante mejora conforme aumenta la longitud de la cadena alifática de los alcoholes, hasta aquellos con 8 a 10 átomos de carbono (C8-

C10), ya que los alcoholes de cadenas más largas de C10 tienen una baja solubilidad en agua (Reybrouck, 1991).

2.3.4.3.1. Etanol (CH₃-CH₂OH)

Se emplea en desinfección de la piel antes de inyecciones cutáneas, así como en desinfección de los termómetros clínicos, siempre que se deje el tiempo suficiente de contacto. Es más efectivo en soluciones acuosas entre 50-70%, ya que para su mejor acción se implica la intervención del agua. A 100% de pureza es poco efectivo (Reybrouck, 1991).

2.3.4.3.2. Isopropanol

Es menos volátil y más efectivo que el etanol. Se emplea igualmente en desinfección de termómetros. Sin embargo, su efecto tóxico (narcótico) es mayor y más duradero que aquel (Reybrouck, 1991).

2.3.4.4 AGENTES DESNATURALIZANTES DE PROTEINAS

2.3.4.4.1 Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos, que son poco dissociables, ejercen su efecto en cuanto a moléculas intactas (sin disociar), que penetran a la célula. El ácido benzoico y el ácido sórbico se usan ampliamente como conservantes alimentarios (Wilson, 1997).

Ciertos ácidos (como el acético, láctico, propiónico) aparecen en alimentos fermentados, actuando como conservantes naturales. Estos mismos, así como el cítrico se pueden añadir a otros tipos de alimentos, para prolongar el periodo de posible almacenamiento de los productos (Wilson, 1997).

2.3.4.5 PRODUCTOS DE ÁCIDO DE PERÓXIDO

Este tipo de germicidas son agentes fuertemente oxidantes, consisten en la combinación con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido peroxiacético. Tienen la ventaja de no dejar ningún residuo indeseable cuando se descomponen. El ácido peroxiacético se degrada en ácido acético y el H_2O_2 simplemente se degrada en agua y moléculas de oxígeno. Esta categoría de sanitizantes son relativamente más efectivos frente a las biopelículas que los amonios cuaternarios, los productos a base de cloro y otros sanitizantes más. (Wilson, 1997).

Los productos de ácido de peróxido presentan una mejor actividad frente a las células bacterianas y algunos virus que contra los hongos, aunque su actividad puede ser mejorada aumentando la concentración y tiempo de contacto. El ácido peroxiacético causa daño en la cápsida de los virus así como a su ácido nucleico. Es corrosivo para ciertos metales. Pierde su efectividad cuando es expuesto a condiciones alcalinas (pH sobre 7.5), surfactantes catiónicos o algunos metales. (Wilson, 1997).

2.4 METODOS PARA EVALUAR LOS DESINFECTANTES

Un desinfectante es eficaz cuando se aplica en la concentración recomendada y reduce rápidamente el número de microorganismos patógenos a niveles que sean seguros para la salud pública. Generalmente se pueden tener en cuenta tres aspectos para la evaluación de un producto: la eficiencia inmediata de la formulación (hace referencia a la remoción mecánica y la inactivación inmediata de microorganismos), persistencia antimicrobiana de la efectividad (es la medida de la habilidad del producto para prevenir la recolonización microbiana en la superficie después de la aplicación del producto) y las propiedades residuales antimicrobianas de la formulación. Para poder llegar a evaluar estas características se emplean los métodos que se exponen a continuación. (Guevara, 1999).

2.4.1 COEFICIENTE FENOLICO.

La determinación del coeficiente fenolito es una técnica de estandarización para determinar la eficiencia bactericida de un compuesto químico con relación al fenol. Es una indicación teórica y aproximada acerca del grado en que un producto desconocido tiene menor actividad desinfectante frente al fenol. Es un procedimiento de dilución en tubo en el cual se recomienda preparar al menos tres diluciones de la muestra: la que proporciona el fabricante, una mas concentrada y una menos concentrada (INS, 1990).

Se valoran las muestras luego de cinco, diez y quince minutos de exposición. Esta técnica es viable cuando se van a evaluar desinfectantes cuyo mecanismo sea semejante al del fenol, es decir, que la muerte de la totalidad de los microorganismos se de a los diez minutos de exposición y no antes. Los riesgos mas frecuentes en esta prueba son: la existencia de microorganismos con diferencias en su susceptibilidad al fenol y que la temperatura a la cual se realiza la prueba sea diferente a la temperatura con la que se utiliza el desinfectante (Cotrino, 1994)

2.4.2 RECUENTO EN PLACA

Las diluciones del microorganismo se vierten en medio de cultivo sólido junto con una concentración del desinfectante y se incuban. Luego del periodo de incubación se observa la ausencia o disminución del crecimiento del microorganismo. Con el resultado obtenido del recuento en placa se puede determinar hasta que concentración actúa el desinfectante sobre una determinada cantidad de microorganismos (Cotrino, 1994).

2.4.3 FILTRACION POR MEMBRANA

Uno de los métodos analíticos mas efectivo para la evaluación de la eficiencia de los desinfectantes es el método de filtración por membrana. Este método incluye la mezcla directa de células o esporas con el agente desinfectante y su posterior

filtración por membrana con varios intervalos de tiempo. Se puede emplear papel de filtro húmedo o seco (Cetrino, 1994).

2.4.4 TECNICA DE DILUCION EN TUBO

Se realizan diferentes diluciones del agente químico. El mismo volumen de cada dilución se dispensa en tubos estériles, a cada tubo se le añade la misma cantidad de una suspensión del microorganismo utilizado como prueba. A determinados intervalos de tiempo se transfiere una alícuota de cada tubo a otro tubo que contenga medio de cultivo. Estos tubos inoculados se incuban a una temperatura óptima de crecimiento del microorganismo utilizado durante 24 o 48 horas. Al cabo de este tiempo se examina el crecimiento del microorganismo mediante la aparición de turbidez en el tubo (crecimiento +) o ausencia de turbidez (crecimiento -). Aquellos que presenten crecimiento negativo indican la dilución a la cual ese agente químico mata al microorganismo utilizado como prueba cuando este es expuesto al desinfectante durante determinado periodo de tiempo (Rojas, 2001).

2.4.5 SUCEPTIBILIDAD MICROBIANA

Se puede realizar mediante el metodo de difusión en agar, conocido como el metodo de Baver & Kurby, se basa en la difusión que presenta un agente antimicrobiano, impregnado en un disco de papel de filtro, sobre la superficie de agar. Se utiliza una suspensión de microorganismo semejante al tubo 0.5 de Mc Farland. Se mezclan 0.001 mL de la suspensión del microorganismo con 9 mL de agar licuado y se vierte en una caja de petri que contenga agar nutritivo o BHI, luego de 5 minutos se colocan sobre la superficie del agar los discos impregnados con las concentraciones del desinfectante a ensayar, comenzando por la menos concentrada. Para la lectura se miden las zonas de inhibición alrededor del disco (Cotrino, 1994).

3. JUSTIFICACION

Las industrias de alimentos, han venido a través del tiempo, mejorando y haciendo más eficaces los controles y procedimientos preventivos, para evitar el ataque progresivo de microorganismos, debido a que estos alteran y contaminan sus productos, provocando grandes pérdidas a nivel económico y sobre todo una pérdida de credibilidad por parte de los consumidores.

Este proyecto surge con el fin de conocer la efectividad de los desinfectantes, como elementos importantes dentro de los protocolos de limpieza y desinfección de una planta procesadora de helados, para así evitar ciertas consecuencias que se pueden presentar dentro de las industrias alimentarias. A su vez es necesario tener en cuenta la importancia que tienen los protocolos de limpieza y el uso correcto de los desinfectantes, los cuales son sustancias que ayudan a eliminar o evitar el crecimiento de microorganismos, que pueden llegar a alterar las características organolépticas del producto.

Todo este tipo de acciones preventivas, con el debido uso de los desinfectantes, convierte a las industrias procesadoras de alimentos, en mejores competidores dentro del mercado, contribuyendo así a generar un valor agregado dentro de los consumidores, y una credibilidad que conlleva a que el consumidor se sienta respaldado y seguro en la adquisición de un producto con los estándares óptimos de calidad.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

- Valorar la eficacia de los desinfectantes DIVOSAN FORTE Y MH, utilizados para la desinfección tanto en las áreas de trabajo como en la maquinaria, de una industria procesadora de helados.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Determinar el tipo de microorganismos que se presentan con mayor incidencia en las áreas de trabajo y en los equipos de la planta de procesamiento en la industria de alimentos.
- Evaluar la efectividad de los desinfectantes utilizados en el proceso, teniendo en cuenta las concentraciones, la recomendada 0.2 v/v, la mitad de esta 0.1 v/v y el doble de la recomendada 0.4 v/v, y los tiempos de exposición de los productos 5, 10 y 15 minutos, para los microorganismos hallados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño de la investigación

5.1.1 Población de estudio y muestra

- Población de estudio: Desinfectantes llamados Divosan FORTE y MH. Empleados en la desinfección de equipos y áreas de trabajo de la industria procesadora de helados.
- Forma de muestreo: Se obtuvo un litro de cada solución sanitizante a analizar de la distribuidora *Jonson Diversey*. A partir de las muestras se prepararon las concentraciones a evaluar en el laboratorio con agua destilada. Las soluciones sanitizantes y cada una de sus concentraciones se conservaron en recipientes plásticos, en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente, durante su uso y en la parte práctica del estudio. Posteriormente, cada solución analizada fue sometida a esterilización en autoclave y desechada por el desagüe.

5.2.1 Variables de estudio

5.2.1.1 Variables dependientes

- Porcentaje de inhibición microbiana de cada solución sanitizante valorada, se midió a través de la diferencia que se presente entre el porcentaje de crecimiento y 100 para cada microorganismo con cada solución.
- Porcentaje de crecimiento que presenten los microorganismos al contacto con cada solución. La variable fue medida por cada estría que se presento de crecimiento, teniendo en cuenta que cada una tiene un valor de 25%.
- Los microorganismos que se vieron afectados con mayor frecuencia en su crecimiento por la acción inhibitoria de los sanitizantes.

5.2.1.2 Variables independientes

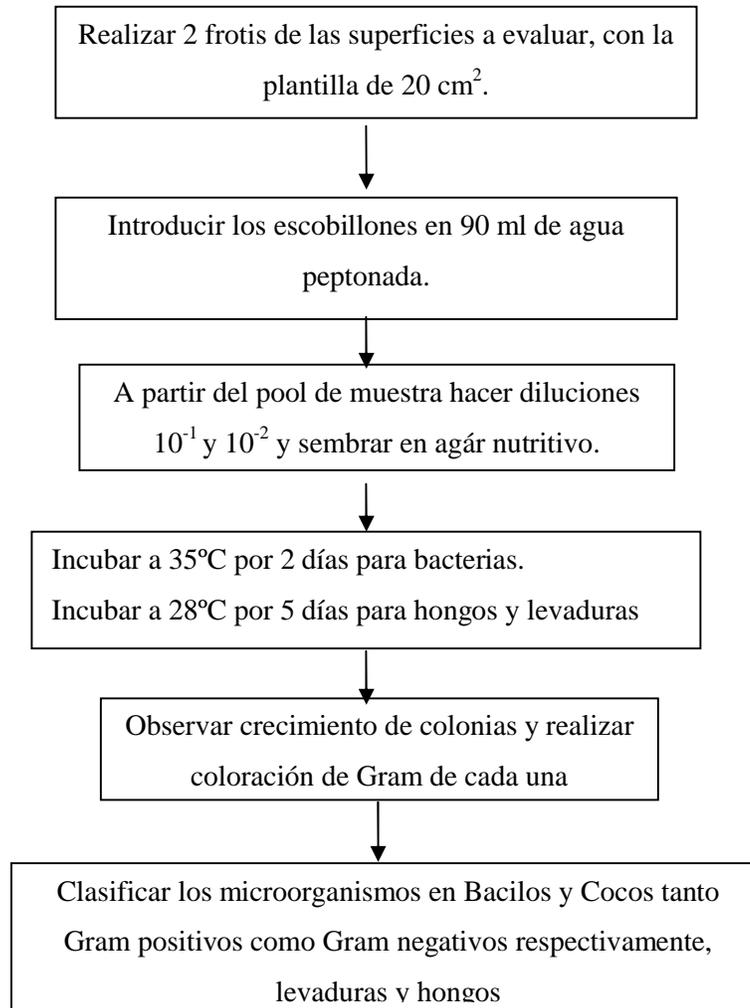
- El tiempo de exposición óptimo de cada solución que inhibió a los microorganismos. Esta variable se midió teniendo en cuenta el menor crecimiento que se presentó como resultado de la siembra de la mezcla microorganismo - sanitizante en los diferentes tiempos que se evaluaron.
- La concentración óptima de cada solución que inhibió a los microorganismos. La variable se evaluó a través del menor crecimiento observado en las siembras del microorganismo con las diferentes concentraciones del sanitizante.

5.3 Puntos de muestreo y obtención de la muestra

Los puntos y áreas de muestreo fueron seleccionados conforme el criterio de la empresa, debido a que ciertas áreas de trabajo y partes de los equipos utilizados en la fabricación de los alimentos, tienen mayor contacto con estos, y por ende presentan una mayor relevancia en la posible contaminación del producto.

- A partir del método del escobillón, se realizaron 2 frotis de las superficies evaluadas (mesones y equipos) en el área donde se tiene contacto con el alimento. Este muestreo se llevó a cabo con la ayuda de una plantilla de 20 cm². Luego se introdujeron los escobillones de cada muestreo en recipientes separados que contenían 90 ml de agua peptonada.
- A partir del pool de muestras de cada área de trabajo, se realizaron diluciones en serie 10 (10^{-1} y 10^{-2}) y se sembró cada dilución en superficie en una caja de agar nutritivo.
- Se incubaron las cajas de Agar Nutritivo a 35°C por 48 horas.
- Se observó el crecimiento de colonias de diferentes morfologías y se realizó coloración de Gram a cada una.
- Se clasificaron los microorganismos según características microscópicas en Bacilos Gram positivos, Bacilos Gram negativos, Cocos Gram positivos, Levaduras y hongos.

5.3.1 Diagrama de flujo: Obtención de la muestra



5.4 Preparación de soluciones a evaluar

5.4.1 Como se dijo anteriormente, se seleccionaron los microorganismos que tenían mayor relevancia en las diferentes áreas de muestreo en la empresa procesadora de alimentos.

Para evaluar la eficacia de los desinfectantes frente a los microorganismos contaminantes seleccionados, se empleó la técnica de dilución en tubo. En este caso el microorganismo se enfrentó a los desinfectantes durante 5, 10, y 15 minutos.

Se valoraron 3 concentraciones de los desinfectantes: la recomendada por el proveedor, la mitad y el doble de la recomendada por el proveedor. Esto aplicó para los dos desinfectantes a evaluar. Las concentraciones se prepararon el primer día de las pruebas microbiológicas con agua destilada.

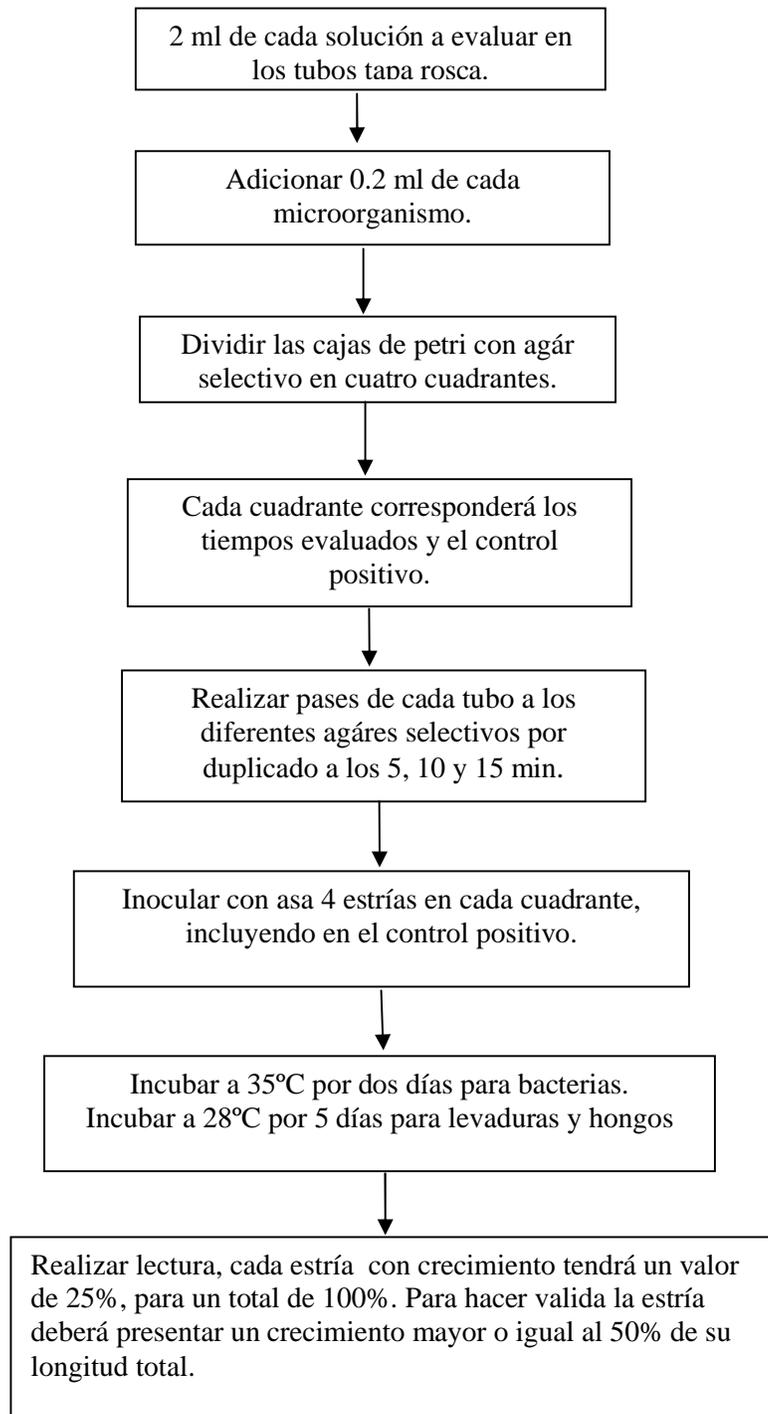
5.5 Evaluación de actividad microbica de desinfectantes

La evaluación microbiológica se basó en la técnica de evaluación de desinfectantes (CARRASCAL, 2003) (GUEVARA, 1997). Los microorganismos a empleados fueron los contaminantes ambientales de la planta de procesamiento de helados. Se utilizaron los volúmenes estipulados por la técnica 2 y 0.2 mL de sanitizante y microorganismo respectivamente, teniendo en cuenta la relación 1/11.

- Se adicionaron 2 mL de cada concentración de las soluciones a evaluar en tubos tapa rosca estériles.
- Se adicionaron 0.2 mL de la solución de microorganismo a cada tubo con la solución a evaluar.
- Se dividieron las cajas de Petri con agár selectivo en cuatro cuadrantes, los cuales corresponderán a los tiempos evaluados y al control.

- Se realizaron pases de cada tubo a los diferentes agáres selectivos por duplicado, a los 5, 10 y 15 minutos, inoculando con asa 4 estrías sobre la superficie de los agáres en cada cuadrante. Adicionalmente, se realizó un control positivo (microorganismo) por cada caja sembrada.
- Se llevaron a incubar las cajas de los agáres selectivos sembrados a 35°C por 48 horas para las cepas de bacterias y a 30°C por 5 días para las cepas de levaduras y hongos.
- Se realizó la lectura de las cajas incubadas de la siguiente manera: observando el número de estrías que presentaron crecimiento del microorganismo, teniendo en cuenta que cada una de ellas tendrá un valor de 25% sobre un total de 100% equivalente a las cuatro estrías del cuadrante. Para considerar válida una estría, ésta debía presentar un crecimiento mayor o igual al 50% de su longitud. Finalmente, se sumaron los valores de las estrías, dato que correspondió al porcentaje de crecimiento del microorganismo confrontado con la solución evaluada. Se anotó dicho porcentaje en las tablas de resultados. Adicionalmente, se halló el porcentaje de inhibición restando al valor de 100 del porcentaje de crecimiento presentado durante cada ensayo.

5.5.1 Diagrama de flujo: Evaluación de actividad microbicida de los desinfectantes



5.6 Control del área de siembra

- Se realizó la desinfección del área de siembra antes y después de su uso con alcohol etílico al 70%, para evitar interferentes que alteraran la prueba. Además se expusieron cajas de petri con agár nutritivo y PDA como control.

5.7 ANALISIS DE LA INFORMACION

Para facilitar la exposición de los resultados se utilizó la ayuda de:

- Tablas donde se muestra el porcentaje de mortalidad de los microorganismos utilizados, en los diferentes tiempos y concentraciones de exposición, según la técnica utilizada.
- Graficas donde se muestra el crecimiento de los microorganismos, antes de ser expuestos a los distintos tiempos y concentraciones de los desinfectantes evaluados.
- Graficas donde se observa el comportamiento de los microorganismos luego de ser expuestos en las diferentes concentraciones y tiempos evaluados, de acuerdo a la técnica utilizada, teniendo en cuenta los porcentajes de inhibición del 25%, 50%, 75% y 100%.
- Los datos que se obtuvieron en la experimentación se analizaron estadísticamente con la prueba ***t de student***, con un nivel de confianza de 75%, y para este fin se plantearan las siguientes hipótesis de trabajo:

- **Hipótesis de nulidad (Ho):** los desinfectantes no inhiben a los microorganismos en un 80%.

$$H_o: \mu \leq 75\%$$

- **Hipótesis alterna (Ha):** los desinfectantes inhiben a los microorganismos en un 80%.

$$H_a: \mu > 75\%$$

- Se realizaron tres repeticiones para la técnica empleada, para que este de acuerdo al método estadístico utilizado y se tenga una muestra representativa.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

A continuación se muestran los resultados que han sido obtenidos, de los procedimientos expuestos anteriormente:

6.1 Obtención de la muestra.

Como se mencionó inicialmente, la muestra de los microorganismos, tomada para llevar a cabo el estudio, se realizó según el criterio de la empresa, debido a que hay áreas de trabajo y puntos donde se presenta mayor contacto por parte del alimento.

Se realizaron dos frotis con el método del escotillón, en dos de los mesones y un frotis en una de las máquinas utilizadas para el empaque del helado. Este muestreo se realizó con la ayuda de una plantilla de 20 cm². Los escobillones fueron depositados en 90 mL de agua peptonada. Con estas muestras se realizaron diluciones de 10⁻², y así se procedió a hacer la siembra en agáres nutritivos, los cuales se incubaron por 48 horas a 35°C. Cumplido el tiempo de incubación se observó el crecimiento de diferentes colonias que presentaban varias morfologías, por esto se tomaron las que presentaron mayor incidencia y se les realizó una

coloración de Gram (FDA, 1995). Para este procedimiento se escogieron colonias que mostraban un aspecto cremoso, de color blanco, esféricas y con borde definido, ya que este tipo de características las presentan microorganismos del genero de los coliformes, los cuales pueden llegar a ser patógenos en grandes cantidades (Bell, 2000) (Figura 2). Al realizar la coloración de Gram se obtuvieron Bacilos Gram negativos, confirmando así la posible contaminación con coliformes (Figura 1). Este tipo de contaminación puede llegar a presentarse debido, a que esta es una industria que trabaja con productos lácteos frescos, los cuales pueden venir con cierta carga microbiana directa de la finca o planta proveedora de estos insumos, o sus recipiente y envases puede que no tengan un riguroso método de desinfección.

TABLA 1.
Porcentajes de los microorganismos encontrados

Microorganismos con mayor incidencia	Porcentaje
Bacilos Gram negativos	60%
Levaduras	30%
Bacilos Gram positivos	10%

Por otra parte se escogieron a su vez, otro tipo de colonias que estuvieron en el segundo lugar de incidencia, estas presentaron un color cremoso, colonias de mayor tamaño y brillantes, se les realizo la coloración de Gram respectiva y se observaron características ovoidales, alargadas, pertenecientes a los de una levadura (Bell, 2000). De este tipo de contaminación se puede decir que lo más probable es que sea proveniente de los ductos de ventilación y entradas a la planta, que no se encuentran con las barreras físicas adecuadas, para evitar su ingreso.

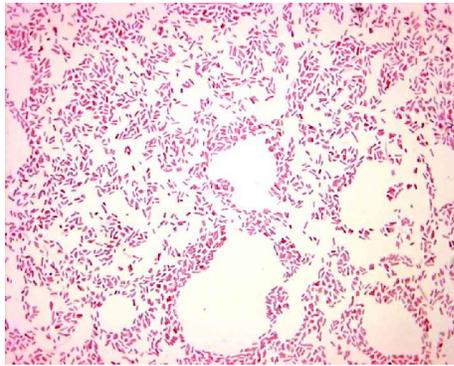


FIGURA 1.

Coloración Bacilos Gram negativos

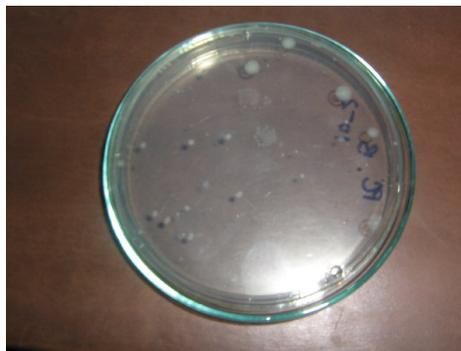


FIGURA 2.

Morfología de colonias con mayor incidencia

6.2 Preparación de la muestra de desinfectantes y su evaluación.

Este procedimiento se llevó a cabo, teniendo en cuenta la proporción utilizada en la planta de procesamiento, la cual es la recomendada por el proveedor; es decir se partió de una concentración de 0.2% v/v. En este caso, esta fue nuestra solución recomendada. Por ende 0.1% v/v fue la mitad de la concentración y 0.4% el doble de la concentración para ambos desinfectantes, tanto para DIVOSAN FORTE como para el MH.

En el momento en que las concentraciones de desinfectantes fueron preparadas, se adicionaron los microorganismos, en cada una de ellas para evaluar su acción desinfectante. Para esto se tuvieron en cuenta los diferentes tiempos de exposición. Este procedimiento se llevó a cabo en agáres VRB y Saboraud respectivamente, dependiendo de las características del microorganismo. Se realizó siembra en estrías para así obtener los diferentes porcentajes de inhibición.

El procedimiento explicado anteriormente se realizó en serie, es decir inmediatamente se tenía crecimiento en los agáres nutritivos, se procedió a desarrollar la siembra en los agáres selectivos, por lo tanto no fue necesario almacenar las muestras de los microorganismos.

6.3 Evaluación de los desinfectantes.

Los siguientes resultados, son los porcentajes de inhibición obtenidos, de los dos tipos de desinfectantes, aplicados para los dos microorganismos que se evaluaron en sus diferentes tiempos de exposición.

TABLA 2.

Eficacia de los desinfectantes en la concentración recomendada (0.2% V/V)

DESINFECTANTE	5 min.	10 min.	15 min.
Divosan Forte	100%	100%	100%
Divosan MH	100%	100%	100%

Los valores que se muestran corresponden al promedio de cada duplicado.

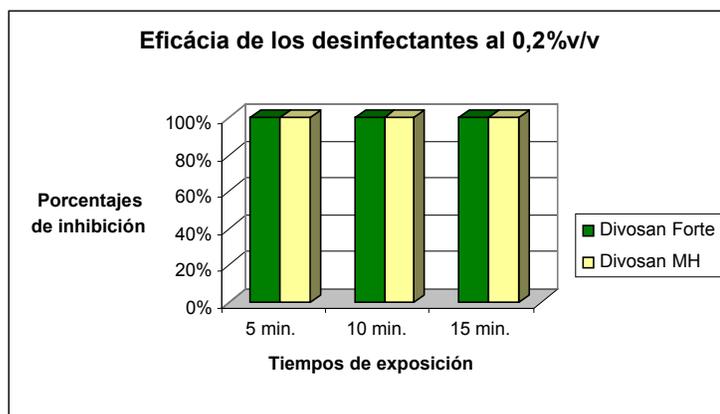


FIGURA 3. Porcentajes de inhibición al 0.2% v/v.

TABLA 3.

Eficacia de los desinfectantes en la concentración 0.1% v/v

DESINFECTANTE	5 min.	10 min.	15 min.
Divosan Forte	0%	75%	100%
Divosan MH	0%	75%	100%

Los valores que se muestran corresponden al promedio de cada duplicado.

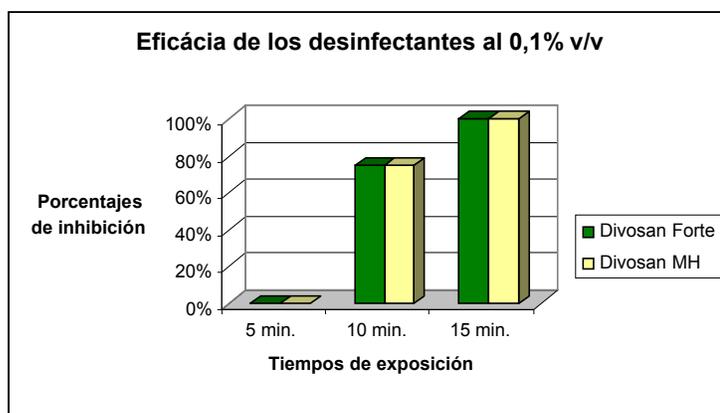


FIGURA 4. Porcentajes de inhibición al 0.1% v/v.

TABLA 4.

Eficacia de los desinfectantes en la concentración 0.4% v/v

DESINFECTANTE	5 min.	10 min.	15 min.
Divosan Forte	100%	100%	100%
Divosan MH	100%	100%	100%

Los valores que se muestran corresponden al promedio de cada duplicado.



FIGURA 5. Porcentajes de inhibición al 0.4% v/v.

6.4 Evaluación *in vivo* de los desinfectantes.

Este procedimiento se llevó a cabo, después de realizar la desinfección de los mesones y las máquinas dentro de la empresa para asegurar que los desinfectantes tienen la misma efectividad que presentan en las pruebas realizadas a nivel de laboratorio, y no son afectados por factores externos como temperatura, pH, o materia orgánica, dureza del agua, entre otros. (Marriott, 2003).

En este caso, solamente se realizó la prueba con la concentración recomendada, es decir 0.2% v/v, debido a que esta concentración es la que se utiliza rutinariamente en la planta de procesamiento y a su vez presentó el 100% de efectividad en las pruebas realizadas anteriormente, en todos los tiempos de evaluación.

Para esto se tomaron muestras de las mismas áreas y tiempos evaluados anteriormente, es decir a los 5, 10 y 15 minutos después del proceso de desinfección. El procedimiento se realizó de la misma manera que el descrito en la parte 6.1 (Obtención de la muestra). A su vez se realizó siembra en agáres nutritivos y así se corroboró la efectividad de los desinfectantes. Su efectividad se muestra a continuación.

TABLA 5.

Eficacia de los desinfectantes en la concentración 0.2% v/v. Prueba *in vivo*

DESINFECTANTE	5 min.	10 min.	15 min.
Divosan Forte	100%	100%	100%
Divosan MH	100%	100%	100%

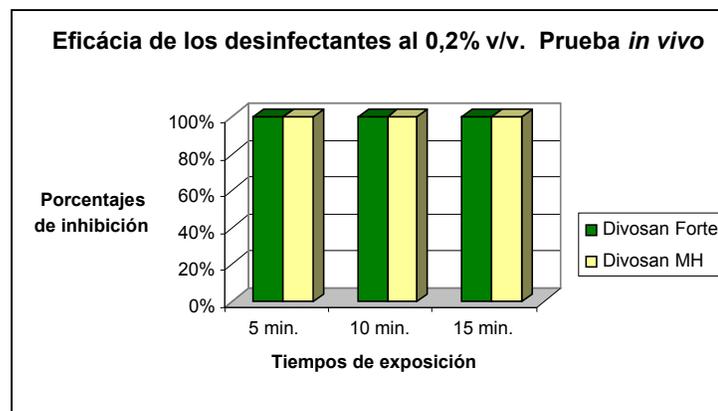


FIGURA 6. Porcentajes de inhibición al 0.2% v/v. Prueba *in vivo*

El ácido peracético, es en este caso el componente activo de los desinfectantes DIVOSAN FORTE y MH, es un agente fuertemente oxidador, por esta razón es reconocido su efecto bactericida, fungicida y virucida. (McDONNELL and RUSSELL, 1999).

Estos dos tipos de desinfectantes resultaron muy efectivos con los dos microorganismos que se evaluaron, ya que mostraron un 100% de inhibición en el crecimiento de estos, casi en la totalidad de ensayos realizados; es decir como se pudo observar en los resultados mostrados anteriormente, los desinfectantes DIVOSAN FORTE y MH, son capaces de inhibir el 100% de los microorganismos aislados y probados, tanto en la concentración recomendada 0.2% v/v, (**Tabla 2, Figura 3**), como en la correspondiente al doble de esta es decir 0.4% v/v, (**Tabla 4, Figura 5**). Esto se determinó para todos los tiempos evaluados 5, 10, 15 minutos respectivamente, por ende la hipótesis de nulidad $H_0: \mu \leq 75\%$ en estos casos, se rechaza y se puede decir que la media poblacional de los microorganismos es mayor a 75%.

En cuanto a la concentración correspondiente a la mitad de la recomendada, en este caso 0.1% v/v, (**Tabla 3, Figura 4**), se observó que presenta fallas en su efectividad, debido a que a los 5 minutos de exposición, el porcentaje de inhibición fue de 0%, y a los 10 minutos fue de 75%, lo cual indica que a esta concentración, los desinfectantes necesitan un mayor tiempo de exposición, el cual está entre 10 y 15 minutos, para lograr un 100% de inhibición de l crecimiento microbiano. Para este caso se acepta la hipótesis de nulidad $H_0: \mu \leq 75\%$, para los 5 minutos de exposición. Para los 10 y 15 minutos esta hipótesis se rechaza, ya que los desinfectantes cumplieron con la disminución en un 75% de los microorganismos.

Para la prueba *in vivo* que se llevó a cabo, los desinfectantes mostraron una efectividad del 100% en la concentración recomendada 0.2% v/v, para los diferentes tiempos en que se evaluaron 5, 10, y 15 minutos, (**Tabla 5, Figura 6**), lo cual indica la estabilidad de DIVOSAN FORTE y MH, a factores físico-químicos y cambios medioambientales que se puedan presentar y afectar así la efectividad de los componentes activos de los mismos. (Marriott, 2003).

El mecanismo que emplea este agente desinfectante, es la destrucción de la actividad celular de las proteínas inhibiendo los mecanismos involucrados en el crecimiento de los microorganismos (McDONNELL and RUSSELL, 1999).

6.5 Resultados del Control del área de siembra.

Con la utilización del alcohol etílico al 70% antes y después de cada una de las siembras realizadas en los agáres, se aseguró la ausencia total de microorganismos contaminantes e interferentes que afectaran los resultados de la prueba, ya que las cajas de pétri tanto con agár nutritivo como agár PDA, no presentaron crecimiento alguno de interferentes contaminantes.

7. CRONOGRAMA DE TRABAJO

ACTIVIDAD	MES					
	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	X	X	X	X	X	
AI SLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS			X			
PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS			X			
ENTREGA TRABAJO FINAL				X		
SUSTENTACIÓN TESIS						X

8. PRESUPUESTO

ITEM	VALOR (Pesos)
Escobillones	20.000
Ensayos microbiológicos	150.000
Desinfectantes	20.000
Papelería	120.000
Imprevistos	40.000
VALOR TOTAL	350.000

- Este proyecto será financiado por la empresa de Helados POPY, la cual presenta la necesidad de resolver este problema, por lo tanto se planteo este trabajo y se llevo a este tipo de acuerdo.

9. CONCLUSIONES

- Se logró evaluar la efectividad de los desinfectantes DIVOSAN FORTE y MH, utilizados en la desinfección de áreas de trabajo y maquinaria en la industria de helados.
- Se consiguió determinar el tipo de microorganismos que se presentan con mayor incidencia en la planta de procesamiento de helados, los cuales pertenecen a Bacilos Gram Negativos en un 60% y Levaduras en un 30%.
- Al evaluar los desinfectantes en las distintas concentraciones utilizadas y en los diferentes tiempos de acción recomendados en el estudio, se pudo observar que estos inhiben el crecimiento de los microorganismos en un 100%, exceptuando la concentración a la mitad de la recomendada en los 5 minutos de exposición.
- En las pruebas *in vivo* realizadas, se corroboró que los desinfectantes a la concentración recomendada 0.2% v/v y los tiempos evaluados, inhiben en un 100% los microorganismos existentes en las áreas de trabajo y maquinaria, por lo tanto se logro determinar que los desinfectantes presentan estabilidad a factores medioambientales.

13. RECOMENDACIONES

- Es necesario estandarizar un protocolo de desinfección en el cual se incluya un registro ordenado y detallado de la cantidad utilizada de cada desinfectante y la firma del encargado de su realización, el cual debe ser regularmente el mismo operario.
- Es recomendable y viable colocar una mayor cantidad de barreras físicas tanto en la ventilación como en las entradas de la planta para así evitar la contaminación de las áreas de trabajo con mesófilos aerobios, polvo y otras partículas del ambiente.
- Se sugiere hacer estudios de costos para comparar la rentabilidad de estos desinfectantes utilizados con otros de diferentes casas comerciales, para así observar las ventajas en cuanto a efectividad y costos.
- Se sugiere realizar una caracterización bioquímica de los microorganismos que se presentan en las áreas de trabajo y maquinas, para saber con exactitud a que genero y especie pertenecen, y así poder utilizar el desinfectante mas recomendable.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIAS, J., CIFUENTES, G., GRANADOS, J., ECHEVERY, L. 2005. Validación de los desinfectantes empleados en una planta de farmacéuticos de uso veterinario. Validación de agentes químicos desinfectantes. Mundo microbiológico. Volumen 3. Número 4: 10-16.
- ALDANA, Luisa y SARASSA, Sandra. 1999. Efecto de desinfectantes y antimicrobianos naturales frente a cepas de *Listeria monocytogenes*. Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogota, Colombia.
- Alasri, M. Valverde, C. Roques, G. Michel, C. Cabassud and P. 1993. Sporocidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, in comparison with chlorine and formaldehyde for ultrafiltration membrane disinfection, *Canadian Journal of Microbiology* 39 (1993), pp. 52-60.
- ASCENZI, L. 1996 Handbook of Disinfectans and Antiseptics. Editorial Marcel Dekker. New Cork.
- BOUNOURE, F. HERVE, F. PHILIPPE, A. 2006. Comparison of hydrogen peroxide and peracetic acid as isolator sterilization agents in a hospital pharmacy. *American Journal of Health-System Pharmacy*, Vol. 63, pp 451-455
- CAMPANI, A. PEREIRA, M. WERNER, S. 2006. In Vivo and In Vitro Evaluation of the Efficacy of a Peracetic Acid-Based Disinfectant for Decontamination of Acrylic Resins. *Braz Dent Vol: 17(2): 117-121*
- CARRASCAL, A. 2003. Manual de laboratorio: Microbiología de Alimentos. 1ª. Edición. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Centro Editorial Javeriano, CEJA. Bogotá, D.C. Colombia. Páginas 166-167.
- COTRINO, Victor. 1994. desinfectantes y procesos de desinfección. Seminario de aspectos químicos, técnicas de valoración y legislación del uso de los desinfectantes en la industria colombiana.
- DEEL, M. 1998. Introducción to sterilization and infection control. Chichill living Stone, London.

- EZPELETA C, SOTA M, IBARRA K, CISTERNA R. 1995. Estudio multicentrico de la actividad antimicrobiana de un nuevo desinfectante. *Rev Esp Quimioter* 18: 118-124.
- FRANKLIN, T.J, G.A. SNOWW. 1989. *Biochemistry of antimicrobial action* (4th edition). Editorial Chapman and Hall, Londres. Capitulo 3.
- GUEVARA, Angélica. 1999. validación de desinfectantes en una planta de productos farmaceuticos. Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de microbiologia. Bogota, Colombia.
- HAYES, P.R. 2002. *Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP*. 2ª. Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. Páginas 359 – 386.
- Hellstrom S, Kervinen R, Lyly M, Ahvenainen-Rantala R, Korkeala H. 2006. Efficacy of disinfectants to reduce *Listeria monocytogenes* on precut iceberg lettuce. *Food and Environmental Higiene*. Vol: 69(7):1565-70.
- HENOUN, N. GRANBASTIEN, K. FAURE, B. GUERY AND G. BEAUCAIRE. 2006. Effect of different stabilized preparations of peracetic acid on biofilm. [Journal of Hospital Infection. Vol 63](#), May 2006, pp 70-72.
- INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. 1990. Control biologico y microbiologico de drogas, medicamentos y cosmeticos. Manual de procedimientos. Bogota.
- JEFFREY, D.J, 1995. Chemical used as desinfectants: Active Ingredients and enhancing additives. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 14(1), 57-74.
- JOLIVET, A. SAUVAGER, F. BONNAURE, M. COLWELL, R. 2006. Virulence of viable but nonculturable *S. Typhimurium* LT2 after peracetic acid treatment. *Applied and Environmental Microbiology* 65 pp. 3229-3232.
- JOLIVET, A. BRAUX, F. SAUVAGER, M. SCHAAN, A. CORMIER, M. 1996. Influence of peracetic acid on *Escherichia coli* H10407 strain in laboratory microcosms. *Canadian Journal of Microbiology* Vol: 42, pp. 60-65.
- LÓPEZ, V. ROMERO, R. URETA, V. 2001. Tratamientos de desinfección de lechugas (*Lactuca saliva*) y frutillas (*Fragaria chiloensis*). *Rev. ALAN* Vol:51, N. 4, pp 175-178.
- MARRIOT, N. 2003. *Principios de Higiene Alimentaria*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. Pag 153-167.

- McDONNELL and RUSSELL. 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 12 N:1 Pág 147-179
- MERCK. Manual de medios de cultivo.
- REYBROUCK, G. 1991. internacional Standarization of disinfectant testing ¿is it posible? J Hosp Infec; 18 (Jun Supl. A): 280-288.
- WILSON, G. 1997. Bacterial resistente, disinfection and sterilization. Editorial Topley and Wilson. Principles of Bacteriology, Virology and Inmunity. Vol. I. pag. 70-91.

RECURSOS ELECTRONICOS:

- CURSO DE MICROBIOLOGIA GENERAL. 1998. Enrique lañez. Accion de los agentes quimicos sobre las bacterias. Madrid, España. Hppt://www.fai.unne.edu.ar/microgeneral/19_micro.htm
- FUDESA. 1999. Jose Maria Paz. Una breve historia de la presevacion y desinfección por calor y sustancias quimicas. Argentina. Hppt://www.drwedsa.com.ar/fudesa