

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de un Desinfectante de extractos naturales, Sobre el Crecimiento de Bacterias y Hongos Provenientes de Ambientes Industriales e Institucionales

**Sofía Cañón Castro
Nicolás Palacio Muñoz**

**Director (a)
Carlos Andrés Aranaga Arias**

**Universidad Santiago de Cali
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2019**

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de un Desinfectante de Uso Comercial, Sobre el Crecimiento de Bacterias y Hongos Provenientes de Ambientes Industriales e Institucionales

**Sofía Cañón Castro
Nicolás Palacio Muñoz**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Microbiólogo**

**Director (a):
Carlos Andrés Aranaga Arias**

**Línea de Investigación:
Investigación e innovación en patologías tropicales
Grupo de Investigación:
QUIBIO**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2019**

ACTA DE SUSTENTACIÓN

IMPACTOS

Relacione el (los) impacto(s) que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico		
Responsabilidad social		
Científico	X	Trabajo de grado de pregrado
Indicadores de Gestión		
Tecnológico		
Técnico		
Ambiental		
Social		
Cultural		

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de un Desinfectante de Extractos Naturales, Sobre el Crecimiento de Bacterias y Hongos Provenientes de Ambientes Industriales e Institucionales

Sofía Cañón Castro ¹ sofiacas1305@gmail.com , Nicolás Palacio Muñoz ² nicolas.palacio00@usc.edu.co Línea de Investigación e Innovación en Patologías Tropicales. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia

RESUMEN

La limpieza y desinfección en ambientes hospitalarios, industriales e institucionales es un procedimiento esencial para el control del riesgo de transmisión de enfermedades, así como de microorganismos contaminantes. Sin embargo, muchos desinfectantes químicos representan un riesgo para el medio ambiente debido a que pueden formar compuestos tóxicos de difícil manejo. El objetivo de este trabajo fue determinar la eficacia antimicrobiana de un desinfectante, cuyos principios activos son extractos naturales, lo que minimiza el impacto ambiental. Para ello, este desinfectante fue validado bajo las Normas Técnicas Colombianas 5150 y 5817. Adicionalmente, se comprobó su actividad sobre aislados de bacterias ácido-lácticas y ácido-acéticas contaminantes de industrias fermentativas, así como levaduras ambientales de una institución educativa. Los resultados obtenidos muestran que el desinfectante a una concentración del 15% es eficaz para la desinfección de bacterias y hongos encontrados en ambientes institucionales e industriales, siendo una alternativa al uso de desinfectantes químicos.

Palabras clave: Desinfectante, dilución-neutralización, NTC 5150, NTC 5817.

Evaluation of the Antimicrobial Activity of a Disinfectant made of natural extracts, on the Growth of Bacteria and Fungi from Industrial and Institutional Environments

ABSTRACT

Cleaning and disinfection in hospital, industrial and institutional environments is an essential procedure for controlling the risk of disease transmission, as well as contaminating microorganisms. However, many chemical disinfectants pose a risk to the environment because they can form toxic compounds that are difficult to handle. The objective of this work was to determine the antimicrobial efficacy of a disinfectant, whose active ingredients are natural extracts, which minimizes the environmental impact. For this, this disinfectant was validated under Colombian Technical Standards 5150 and 5817. Additionally, its activity was verified on isolates of lactic acid and acid-acetic bacteria contaminating fermentation industries, as well as environmental yeasts of an educational institution. The results obtained show that the disinfectant is effective for the disinfection of bacteria and fungi found in institutional and industrial environments, being an alternative to the use of chemical disinfectants.

Keywords: Disinfectant, NTC 5150, NTC 5817

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación generada por agentes infecciosos es una de las principales amenazas a la salud pública. La limpieza y desinfección de superficies inertes en ambientes hospitalarios, industriales, institucionales y domésticos, es uno de los más sencillos y principales mecanismos de control para la disminución del riesgo de transmisión de enfermedades.

La limpieza, hace referencia a la eliminación o remoción de materia orgánica visible presente en la superficie, mientras que la desinfección se refiere a la inactivación de prácticamente todos los microorganismos patógenos conocidos, pero no a todas las formas de vida microbiana como las esporas [1].

Adicional al riesgo que representan los microorganismos para la salud, en la industria alimentaria, cosmética y de derivados biológicos, la actividad microbiológica es un factor negativo que disminuye la eficiencia y aumenta los costos. Ejemplo de ello es la contaminación bacteriana en procesos fermentativos, particularmente, en fermentaciones para producción de etanol, en la cual se utilizan melazas de caña o maíz como materia prima. Los contaminantes bacterianos más frecuentes son bacterias ácido lácticas, predominando especies del género *Lactobacillus* [2]. Estas bacterias crean un descenso constante del carbono disponible en la materia prima para la transformación a etanol, además de competir por factores de crecimiento necesarios para que la levadura realice su proceso fermentativo [3]. Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) son el contaminante primario de las destilerías, estas bacterias constituyen un grupo de bacterias Gram positivas, no esporuladas, con morfología de cocos y de bacilos, productoras de ácido láctico, como producto mayor de fermentación de carbohidratos [4], lo que genera disminución en la producción de etanol, ya que por cada gramo de ácido láctico, se pierden 0,51 g de etanol [5]. Se ha intentado minimizar los efectos de la actividad bacteriana de diversas formas. La lucha contra plagas y enfermedades y la mejor organización de la cosecha y el transporte, son grandes pasos que han mejorado esta situación, así como el énfasis en la limpieza y desinfección en el área de molido, a lo que se añade en los últimos años la aplicación de desinfectantes en estos procesos [6].

Las operaciones de limpieza y desinfección incluyen diferentes tareas, en las que se utilizan métodos, procesos y productos muy distintos entre los que se encuentra el uso de sustancias químicas [7] como grupos de alcoholes, liberadores de cloro, aldehídos, compuestos oxidantes, fenólicos, compuestos de amonio cuaternario, etc [8]. Estos productos son muy utilizados tanto en el hogar, como en instituciones, industrias, entre otros. Algunas de estas sustancias pueden ser peligrosas para la salud y/o para el medio ambiente. Las sustancias químicas de muchos productos de limpieza son contaminantes comunes que contribuyen a la niebla tóxica, reducen la calidad del agua potable y son tóxicos para los animales [9]. Estas sustancias químicas al liberarse al medio ambiente son capaces de degradarse en compuestos mucho más tóxicos con capacidad de acumularse y dañar tejidos de seres vivos, además problemas en la eutrofización de aguas, causando un menor nivel de oxígeno, lo que causa la muerte de animales acuáticos y la contaminación del aire y suelo por la evaporación de alcoholes y otros disolventes [5]. Es por esto que se plantea la necesidad de buscar diferentes alternativas como lo son los desinfectantes naturales, los cuales están compuestos de ingredientes de origen natural, biodegradables (normalmente un 60% o más), sin contenido de sustancias tóxicas o peligrosas para la salud o el medio ambiente. El desinfectante a investigar, está hecho a base de extractos naturales, totalmente biodegradable y de fácil manejo debido a que no es tóxico ni mutagénico. Sus componentes activos (aproximadamente el 70%), son derivados de aceites esenciales de terpenos de limoneno y frutos cítricos [10].

Según su ficha técnica, es efectivo contra hongos, virus y bacterias, incluyendo aquellas cepas causantes de enfermedades y pérdidas en la industria como: *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans* [10].

En Colombia, la normatividad para la evaluación de los desinfectantes se establece de acuerdo con el lugar de desinfección (recintos hospitalarios, industrias, instituciones, etc), tipo de microorganismo

(bacterias, virus, hongos o micobacterias), entre otros. Algunas de las normas más utilizadas son las Normas Técnicas Colombianas (NTC) 5473, 5329, 5732, 5150 y 5817.

En este estudio se aplicaron las normas NTC 5150 y 5817. La NTC 5051, establece un método de prueba (Fase 1) y los requisitos mínimos para verificar la actividad bactericida de los antisépticos y desinfectantes químicos que forman una preparación homogénea físicamente estable en agua [11]; mientras que la NTC 5817, especifica un método de ensayo y los requisitos mínimos para evaluar la actividad fungicida y levuricida de los productos antisépticos y desinfectantes químicos que forman una preparación homogénea físicamente estable cuando se diluyen con agua dura, o en el caso de productos listos para su uso, con agua [12]. Estas normas son aplicables a los productos utilizados en la agricultura (pero no para la protección de cultivos), en el servicio doméstico, en higiene alimentaria y otros campos industriales, y para aplicaciones institucionales, médicas y veterinarias [11]. De esta forma, se pretende determinar la eficacia antimicrobiana de un desinfectante de uso comercial a base de productos naturales sobre el crecimiento de aislados bacterianos y fúngicos de ambientes industriales e institucionales, mediante el método de dilución-neutralización.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Lugar de Investigación

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Santiago de Cali.

2.2 Normatividad

Para determinar la actividad bactericida, fungicida y levuricida del desinfectante, la metodología utilizada se fundamentó en las Normas Técnicas Colombianas (NTC) 5150 “Antisépticos y Desinfectantes Químicos. Actividad antibacteriana básica. Métodos de prueba y Requisitos” y NTC 5817 Antisépticos y Desinfectantes Químicos. Ensayo Cuantitativo de Suspensión para la Evaluación de la Actividad fungicida y Levuricida de los Antisépticos y Desinfectantes Químicos Utilizados en el Área Alimentaria, Industrial, Doméstica E Institucional. Método de Ensayo y Requisitos”.

2.3 Desinfectante

El producto evaluado fue un desinfectante hecho a base de extractos naturales, efectivo biocida, totalmente biodegradable y de fácil manejo ya que no es tóxico o mutagénico. Sus componentes activos (70% promedio), son derivados de aceites esenciales de terpenos de limoneno y frutos cítricos; por lo cual es autorizado y reconocido por la F.D.A. como GRAS (Generally Recognized As Safe) [10].

2.4 Microorganismos de Ensayo

Según la NTC 5150, los microorganismos obligatorios que se deben evaluar son las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, y según la NTC 5817 las cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus niger* ATCC 16404. Adicional se evaluaron *Enterococcus hirae* ATCC 10541 y *Escherichia coli* ATCC 10536, así como bacterias ácido lácticas y ácido acéticas aisladas del mosto de la caña de un ingenio azucarero, las cuales son consideradas como contaminantes para la fermentación alcohólica. También se presentó una levadura ambiental aislada del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Santiago de Cali, la cual puede interferir con los procesos propios del laboratorio, y una levadura aislada del bulevar de la misma institución (Figura 1), estos microorganismos fueron introducidos en esta investigación, con el fin de determinar

la actividad antimicrobiana del desinfectante sobre cepas ambientales específicas encontradas en industrias e instituciones.

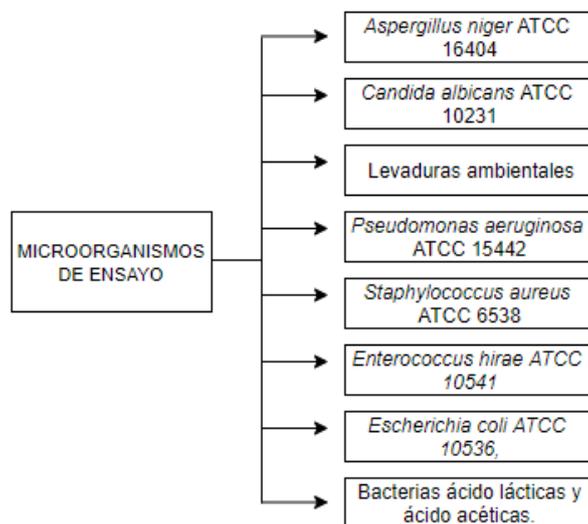


Figura 1. Microorganismos de Ensayo. Microorganismos utilizados para determinar la actividad bactericida, levuricida y antifúngica del desinfectante de extractos naturales.

2.5 Preparación de la Suspensión de Ensayo (N) y Suspensión de Validación (Nv)

Para el crecimiento bacteriano se utilizó Agar Tripticasa de Soya (TSA), incubando las cepas por un periodo de 24 horas a 37°C, mientras que para las cepas fúngicas el crecimiento fue establecido en Agar Extracto de Malta (MEA), incubando durante 48 horas a temperatura ambiente como lo indicado en las normas. Una vez que se obtuvieron colonias de cada uno de los microorganismos, se elaboró una Suspensión de Ensayo (N), transfiriendo asadas de células a un tubo de ensayo con 5ml de agua destilada estéril. Se agitó con vortex y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600nm hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,5 y 0,7, lo que indicó una densidad celular entre $1,5 \times 10^8$ - 5×10^8 UFC/ml para bacterias mientras que para cepas fúngicas una densidad celular entre $1,5 \times 10^7$ - 5×10^7 UFC/ml. Estos resultados fueron verificados mediante la siembra por superficie de diluciones seriadas. En el caso de hongos filamentosos y levaduras, se prepararon diluciones 10^{-3} y 10^{-4} y se sembraron 100µl por duplicado en agar MEA. Para las cepas bacterianas se prepararon diluciones 10^{-4} y 10^{-5} y se sembraron 100µl por duplicado en agar TSA. Una vez validada la lectura espectrofotométrica, la N fue preparada siempre de la misma forma.

Una vez obtenida N, se preparó la suspensión de validación (Nv) tanto fúngica como bacteriana, las cuales comprendieron la dilución 10^{-3} y 10^{-4} , respectivamente.

2.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana del desinfectante de extractos naturales

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana del desinfectante, se tomaron 800µl del desinfectante y 100µl de agua destilada estéril en un tubo de 1,5ml. Se añadieron 100µl de la suspensión de ensayo (N) y se incubó a 20°C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron diluciones hasta 10^{-5} y 10^{-6} en agua destilada estéril. A partir de estas diluciones, se realizaron siembras por superficie según las condiciones de crecimiento de cada microorganismo.

2.7 Prueba de validación (neutralizante)

Las pruebas de validación se realizaron bajo condiciones limpias (agua estéril) y *E. coli* como microorganismo de prueba y todas las sustancias (desinfectante, agua estéril, suspensión de validación (Nv), neutralizante) se dejaron en un baño de agua controlado a $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para la realización de la prueba de validación del neutralizante, se añadieron 800 μl del neutralizante y 100 μl del desinfectante a un tubo de 1,5ml, el cual se dejó en un baño de agua controlado a $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Se mezclaron y se dejaron en contacto durante 5 min \pm 10s en un baño de agua controlado a $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Después del tiempo de contacto, se añadieron 100 μl de la suspensión de validación (Nv) al tubo, (en donde Nv debe estar entre $3,0 \times 10^2$ y $1,6 \times 10^3$ UFC/ml para hongos y $6,0 \times 10^2$ y 3×10^3 UFC/ml para bacterias). Se mezclaron y dejaron reposar durante 30 min \pm 1 min a $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Después del tiempo de reposo, se tomó una muestra de 100 μl del tubo y se sembró por duplicado mediante la siembra en superficie. Las cajas con bacterias se incubaron durante 24 horas a 37°C y los hongos a temperatura ambiente por 48 horas para luego efectuar el recuento. Este procedimiento se realizó con todos los microorganismos de ensayo (Figura 1). Se realizó un control de neutralización el cual consistió en sembrar una dilución de Nv de cada uno de los microorganismos comparando el número de UFC con la validación.

Los compuestos ensayados como neutralizantes fueron: lecitina 30 mg/ml, tween 0,3 ml/ml, L. Histidina 10 mg/ml, tiosulfato 50 mg/ml, saponina 0,3 g/ml, extracto de levadura 100 mg/ml, yema de huevo al 5%, una mezcla de todos los anteriores, yema de huevo-tween 0,3 ml/ml y tween 0,3 ml/ml - lecitina 30 mg/ml.

2.8 Establecimiento de las condiciones experimentales

Los ensayos de dilución-neutralización se realizaron bajo dos condiciones experimentales: condiciones sucias en las cuales se utilizó leche en polvo y glucosa como sustancia interferente y condiciones limpias en las cuales la sustancia interferente se reemplazó por agua destilada estéril. Se empleó como temperatura obligatoria $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ tanto para bacterias como para hongos. Las concentraciones del desinfectante se ajustaron mediante un ensayo preliminar, tomando en cuenta las condiciones reales de uso del desinfectante evaluado (0,5, 1,25 y 2,5%). De esta forma, se realizaron ensayos preliminares con la bacteria *E. coli*, bajo las condiciones establecidas por el fabricante, y se adicionaron 4 concentraciones de 5, 10, 15 y 20% por 5 minutos como tiempo de contacto, que es uno de los tiempos establecidos por la norma NTC 5150. Para el establecimiento de las concentraciones antifúngicas se utilizó la cepa *C. albicans* adicionando las concentraciones establecidas por la ficha técnica del desinfectante y 2 concentraciones más de 5 y 10% por 15 minutos como tiempo de contacto obligatorio según lo estipula la norma NTC 5817. Estas concentraciones fueron evaluadas bajo condiciones limpias.

El desarrollo de esta metodología se dividió en 5 etapas:

1. Control del método dilución-neutralización (C).
2. Control de toxicidad del neutralizante (B).
3. Control de las condiciones experimentales (A).
4. Implementación del método dilución neutralización (Na).
5. Verificación del método dilución neutralización.

2.9 Control del método dilución-neutralización (C)

Se añadieron 100µl de sustancia interferente y 100µl de agua estéril (diluyente), en un tubo de 1,5ml. Se añadieron 800µl de desinfectante, se mezcló y se inició el cronómetro con los tiempos seleccionados. Se mezcló y se transfirieron 100µl de esta mezcla a un tubo con 800µl de neutralizante. Se colocó el tubo en un baño de agua a $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 min (tiempo de neutralización). Después del tiempo de contacto se añadieron 100µl de la suspensión de validación (Nv), se mezcló y se colocó el tubo en un baño maría a $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Se mezcló y se inocularon 100µl de esta mezcla por duplicado mediante la siembra en superficie. Las cajas con bacterias se incubaron durante 24 horas a 37°C y los hongos a temperatura ambiente por 48 horas para luego efectuar el recuento.

2.10 Control de toxicidad del neutralizante (B)

Se transfirieron 800µl de neutralizante (extracto de levadura 100 mg/ml) y 100µl de sustancia interferente en un tubo de 1,5ml. Se añadieron 100µl de la suspensión de validación (Nv). Se mezcló y se colocó el tubo en un baño de agua a $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 min (tiempo de neutralización). Posteriormente se mezcló, y se inocularon 100µl por duplicado mediante la siembra en superficie. Las cajas con bacterias se incubaron durante 24 horas a 37°C y los hongos a temperatura ambiente por 48 horas, para luego efectuar el recuento.

2.11 Control de las condiciones experimentales (A)

Para crear las condiciones sucias, se añadieron 100µl de sustancia interferente, y 100µl de la suspensión de validación (Nv) en un tubo de 1,5ml. Luego de mezclar, se colocó el tubo a temperatura $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 2 min. Se añadieron 800µl de agua destilada estéril, se mezcló y se inició el cronómetro con los tiempos seleccionados. Se mezcló y se inocularon 100µl de esta mezcla por duplicado mediante la siembra en superficie. Las cajas con bacterias se incubaron durante 24 horas a 37°C y los hongos a temperatura ambiente por 48 horas, para luego efectuar el recuento.

2.12 Implementación del método dilución neutralización (Na)

Se realizó bajo condiciones limpias y sucias la implementación del método dilución-neutralización. Para las condiciones limpias, se añadieron 100µl de agua destilada estéril en un tubo de 1,5ml, para las condiciones sucias el agua fue sustituida por 100µl de sustancia interferente, y a cada uno se le añadieron 100µl de la suspensión de ensayo (N) en un tubo de 1,5ml. Se mezcló y se colocó el tubo a la temperatura de $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 2 min (tiempo de premezclado). Se añadieron 800µl del desinfectante, se mezcló y se inició el cronómetro en los tiempos seleccionados. Se tomaron 100µl de esta mezcla y se transfirieron a un tubo que contenía 800µl de neutralizante y 100µl de agua destilada estéril. El tubo fue colocado en un baño de agua a $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 min (tiempo de neutralización). Se mezcló con vórtex y se sembraron 100µl por duplicado en agar TSA para bacterias y MEA para los hongos, mediante la siembra en superficie. Las cajas con bacterias se incubaron durante 24 horas a 37°C y los hongos a temperatura ambiente, posteriormente se efectuó el recuento del número de supervivientes por ml en la mezcla de los ensayos (Na).

2.13 Verificación del método dilución neutralización

La verificación del método se realizó teniendo en cuenta el cumplimiento de los límites básicos estipulados en el numeral 5.6.2 de la norma NTC 5150, y el numeral 5.7.3 de la norma NTC 5817 (Tabla 1).

Tabla 1. Límites básicos establecidos. Límites estipulados por las normas NTC 5150 y 5817 para la implementación del método dilución-neutralización.

N (Hongos)	Está comprendido entre	$1,5 \times 10^7$ y $5,0 \times 10^7$	$7,17 \leq \lg N \leq 7,70$
N (Bacterias)		$1,5 \times 10^8$ y $5,0 \times 10^8$	$8,17 = \lg N = 8,70$
N ₀ (Hongos)		$1,5 \times 10^6$ y $5,0 \times 10^6$	$6,17 \leq \lg N_0 \leq 6,70$
N ₀ (Bacterias)		$1,5 \times 10^7$ y $5,0 \times 10^7$	$7,17 = \lg N_0 = 7,70$
Nv ₀ (Hongos)		30 UFC/ml y 160 UFC/ml	
Nv ₀ (Bacterias)		60 UFC/ml y 300 UFC/m	
Nv (Hongos)		$3,0 \times 10^2$ y $1,6 \times 10^3$ UFC/ml	
Nv (Bacterias)		$6,0 \times 10^2$ y 3×10^3 UFC/ml	
A, B, C Son iguales o superiores a $0,05 \times Nv_0$. para bacterias y 0,5 para hongos			
Al menos una concentración de bacterias debe demostrar un $\text{LOG R} \geq 5$ y al menos una concentración debe demostrar un $\text{LOG R} < 5$, para hongos debe demostrar un $\text{LOG} \geq 4$ y un $\text{LOG} < 4$.			
El control de los recuentos de los valores medios ponderados: el cociente no es inferior a 5 ni superior a 15.			

DONDE:

N: número de células por ml en la suspensión de ensayo.

Na: número de supervivientes por ml en la mezcla de ensayo.

Nv: número de células por ml en la suspensión de validación.

A, B Y C: número de supervivientes en el control de las condiciones experimentales "A", control del neutralizante "B", validación del método "C" al final del tiempo de contacto y de los tiempos definidos.

N₀ y Nv₀: número de células por ml en las mezclas de ensayo y validación al comienzo del tiempo contado, es la décima parte de la media aritmética ponderada de las mezclas debido a la dilución por la adición del producto y de las sustancias interferentes.

log R: la reducción logarítmica de la concentración microbiana ($\log N_0 - \log Na$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de la concentración microbiológica

Para la determinación de la concentración microbiológica en los cultivos de trabajo, la turbidez de la suspensión de ensayo (N) fue medida a 600 nm hasta alcanzar una absorbancia entre 0,5 y 0,7, lo cual corresponde con una densidad celular de 10^7 UFC/ml para cepas fúngicas y 10^8 UFC/ml para cepas bacterianas, lo cual se encuentra dentro de los parámetros exigidos por las NTC 5817 y 5150 (Tabla 1). Estos resultados fueron confirmados mediante la realización de siembra por superficie de diluciones seriadas de cada uno de los microorganismos (Figura 2).

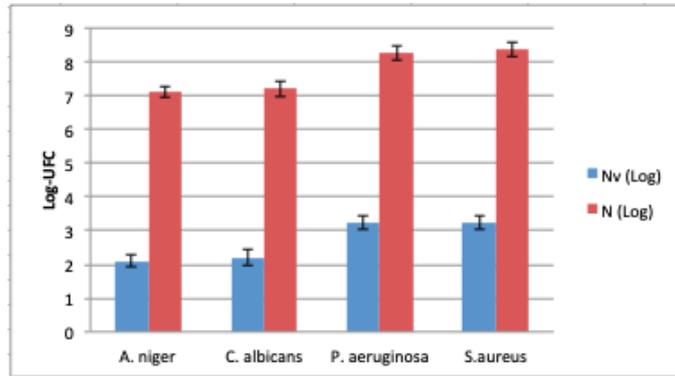


Figura 2. Densidad celular de la suspensión de ensayo (N) y suspensión de validación (Nv). El crecimiento microbiano es presentado en unidades logarítmicas. Se presentan datos tanto para las cepas fúngicas como bacterianas. Las barras de color azul representan la concentración celular de la suspensión de validación (Nv), la cual debe estar entre $3,0 \times 10^2$ - $1,6 \times 10^3$ UFC/ml para las cepas fúngicas y entre $6,0 \times 10^2$ - 3×10^3 UFC/ml para las bacterianas. Las barras de color rojo representan la concentración del cultivo en la suspensión de ensayo (N), en donde N debe estar entre $1,5 \times 10^7$ - $5,0 \times 10^7$ UFC/ml para las cepas fúngicas y entre $1,5 \times 10^8$ - $5,0 \times 10^8$ UFC/ml para las cepas bacterianas, como están establecidas en las normas NTC 5150 y 5817.

3.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana del desinfectante

La evaluación de la actividad antimicrobiana del desinfectante se realizó a una concentración del 80%. Los resultados obtenidos mostraron que hubo inhibición del crecimiento de todos los microorganismos ensayados, demostrando así que el desinfectante presenta actividad antimicrobiana (Datos no mostrados). Esto puede ser posible, ya que la actividad antimicrobiana de este desinfectante se debe a la mezcla de aceites esenciales compuestos de terpenos, terpenoides, aldehídos y alcoholes que le ayudan a que tengan un alto nivel de actividad antimicrobiana por tener un porcentaje significativo en volatilidad [10, 15]. Los aceites de frutos cítricos han sido muy evaluados por su gran actividad antimicrobiana como una alternativa a los antimicrobianos químicos ya que cuentan con un promedio de 40 compuestos, en especial el quimiotipo limoneno, compuesto de este desinfectante que ejerce un gran potencial frente a *S. aureus* entre otros microorganismos [16].

3.3 Prueba de validación y Toxicidad del neutralizante (B)

Para la determinación de la actividad del neutralizante, se utilizó *E. coli* ATCC 10536 como microorganismo de prueba. Los resultados obtenidos indicaron que de los 10 posibles neutralizantes recomendados en las normas NTC 5150 y 5817, sólo el extracto de levadura a una concentración de 100 mg/ml logró neutralizar el desinfectante de extractos naturales a una concentración del 80% evaluado a un tiempo de contacto de 5 min (Tabla 2). Adicionalmente, no mostró tener ningún efecto sobre el crecimiento de los microorganismos ensayados ni aumentar el crecimiento en los tiempos de ensayo (Datos no mostrados).

El extracto de levadura es un producto rico en vitaminas, aminoácidos y otros factores de crecimiento; es utilizado en una amplia variedad de medios de cultivo como una excelente fuente de nutrientes y es muy usado en industrias de alimentos [17]. Al ser un compuesto de aminoácidos, péptidos, polisacáridos, sacaridos y ácidos orgánicos, no presenta alguna acción de toxicidad en los microorganismos, y en casos particulares es beneficioso para la nutrición de los mismos [18]. La compleja variedad de compuestos que tiene el extracto de levadura, puede interactuar con los compuestos activos del desinfectante, apantallando su actividad antimicrobiana o inhibiendo por completo. Es parte esencial del caldo neutralizante Dey-Engley, el cual es utilizado para la evaluación de desinfectantes [19].

Tabla 2. Neutralizante ensayados en la validación del neutralizante. N: determinación de la concentración bacteriana después de la neutralización del desinfectante. La suspensión de ensayo (N) debe estar entre $6,0 \times 10^2$ - 3×10^3 UFC/ml según la norma NTC 5150. El extracto de levadura (100 mg/ml) fue la única sustancia que logró neutralizar el desinfectante.

Neutralizantes	N
Lecitina	$< 6 \times 10^2$
Tween	$< 6 \times 10^2$
Saponina	$< 6 \times 10^2$
L. histidina	$< 6 \times 10^2$
Yema de huevo	$< 6 \times 10^2$
Tiosulfato de sodio	$< 6 \times 10^2$
Extracto de levadura	$2,7 \times 10^3$
Tween + Lecitina	$< 6 \times 10^2$
Yema de huevo + Tween	$< 6 \times 10^2$
Mezcla de todos	$< 6 \times 10^2$

3.4 Establecimiento de las condiciones experimentales para el método dilución-neutralización

Los resultados obtenidos en los ensayos preliminares con *E.coli* ATCC 10536 y *C. albicans* ATCC 10231 se ven reflejados por el Log R que presentaron cuando se realizaron los ensayos a diferentes concentraciones del desinfectante (5, 10, 15 y 20%), incluidas las establecidas por la ficha técnica del producto (0,5, 1,25 y 2,5%).

Se realizó el ensayo con un tiempo de contacto de 5 min para *E. coli* ATCC 10536, según la NTC 5150, a las concentraciones establecidas por la ficha técnica del desinfectante además de cuatro concentraciones adicionales, las cuales fueron: 5, 10, 15, y 20%, en donde solo las concentraciones de 15 y 20% cumplieron con la reducción de 5UL (Tabla 3). Al obtener la concentración mínima inhibitoria aceptada, la cual fue de 15% con un tiempo de contacto de 5 min, se tomó una concentración por encima de 15% y una por debajo, junto con dos tiempos de contacto adicionales de 10 y 15 min.

Para *C. albicans* ATCC 10231 el ensayo fue realizado con un tiempo obligatorio de 15 min según la NTC 5817, a las concentraciones establecidas por la ficha técnica del desinfectante y con dos concentraciones adicionales las cuales fueron: 5 y 10%, en donde solo la concentración de 5% cumplió con la reducción de 4UL (Tabla 4). Al obtener la concentración mínima inhibitoria aceptada, la cual fue de 5% con un tiempo de contacto de 15 min, se tomaron dos concentraciones adicionales, junto con dos tiempos de contacto adicionales de 5 y 10 min.

Para determinar los tiempos de contacto y la concentración más eficaz para la aplicación de este producto, se tomaron las tres concentraciones con tres tiempos de contacto los cuales fueron: 2,5, 5, 10% con 5, 10,15 min para cepas fúngicas y 10, 15, 20% con 5, 10,15 min para cepas bacterianas (Figura 3).

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria de la actividad bactericida del desinfectante de extractos naturales. La concentración mínima inhibitoria se realizó con la bacteria *E.coli*. La reducción logarítmica del crecimiento microbiano (Log R) debe ser mayor o igual a 5 según lo establecido por la NTC 5150. **N₀**: número de células por ml en las mezclas de ensayo al comienzo del tiempo contado, es la décima parte de la media aritmética ponderada de las mezclas debido a la dilución por la adición del producto y de las sustancias interferentes. **Na**: número de supervivientes por ml en la mezcla de ensayo.

Concentración del producto (%)	Log N ₀	Log Na	Log R (N ₀ - Na)
0,5%	7,4	3,5	< 5
1,25%	7,4	3,5	< 5
2,5%	7,4	3,5	< 5
5%	7,4	3,5	< 5
10%	7,4	2,9	< 5
15%	7,4	2,1	5,3
20%	7,4	0,6	6,8

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria de la actividad levuricida del desinfectante de extractos naturales. La concentración mínima inhibitoria se realizó con *C. albicans*, la reducción logarítmica (log R) del crecimiento fúngico debe ser mayor o igual a 4 Según lo establecido por la NTC 5817.

Concentración del producto (%)	Log N ₀	Log Na	Log R (N ₀ - Na)
0,5%	6,3	4,0	< 3
1,25%	6,3	3,8	< 3
2,5%	6,3	3,8	< 3
5%	6,3	3,3	< 3
10%	6,3	2,1	4,2

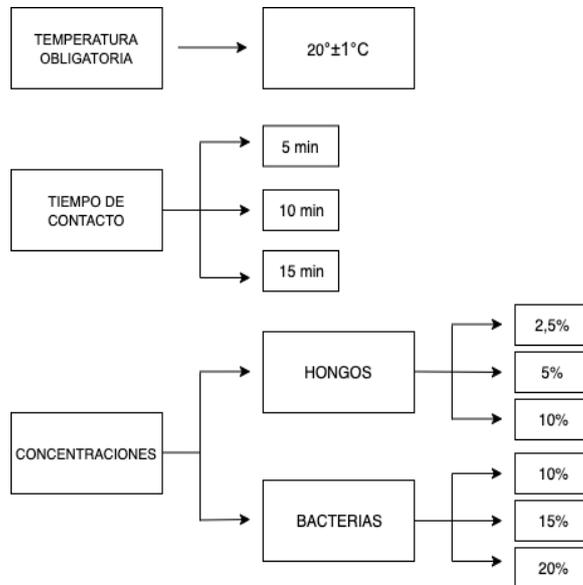


Figura 3. Condiciones experimentales obligatorias y adicionales aplicadas en el método dilución - neutralización. Condiciones establecidas después de haber realizado todos los ensayos preliminares.

Los resultados obtenidos muestran una variación en el grado de sensibilidad de las diferentes cepas bacterianas al desinfectante (Tabla 5), siendo la cepa de *E. coli* ATCC 10536 la más sensible con una disminución del crecimiento de 5,3 UL a una concentración de 15% y 5 min de contacto, mientras que las cepas de *P. aeruginosa* ATCC 15442 y *E. hirae* ATCC 10541 son las menos sensibles con una reducción del crecimiento de 5,1 y 5,2 UL respectivamente, a una concentración del 15% después de 15 min de contacto (Tabla 5).

Las cepas de *C. albicans* ATCC 10231 y *A. niger* ATCC 16404, mostraron una sensibilidad más homogénea que las cepas bacterianas, con una disminución de crecimiento de 4,2 UL a una concentración del 10% y 5 min como tiempo de contacto (Tabla 6).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se determinó que el mejor tiempo de contacto para que el desinfectante inhiba el crecimiento de las cepas bacterianas fue de 15 min y 5 min para las cepas fungicas. La concentración requerida del desinfectante varió en las cepas bacterianas, siendo la concentración de 15% la que cumple con la disminución de al menos 5 UL para todas las cepas ensayadas como estipula la NTC 5150.

En el caso de la actividad fungicida y levuricida, a una concentración del 10% se observa al menos una disminución de 4 UL, como lo establece la NTC 5817 (Tabla 6) Es por ello que se estableció que para la realización de ensayos de actividad antimicrobiana en condiciones sucias, el tiempo de contacto óptimo para los microorganismos es de 15 min y 5 min, mientras que la concentración del desinfectante para ensayos bactericidas es de 15% y para ensayos fungicidas y levuricidas de 10%.

Tabla 5. Actividad bactericida del desinfectante de extractos naturales a los tiempos de 5min, 10min, 15min y concentraciones de 10, 15 y 20% estipulados para *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. hirae* y *E. coli* con una reducción logarítmica mayor o igual a 5: La reducción logarítmica es determinada por el número de células por ml en las mezclas de ensayo al comienzo del tiempo contado (N_0) (la décima parte de la media aritmética ponderada de las mezclas debido a la dilución por la adición del producto y de las sustancias interferentes) menos el número de supervivientes por ml en la mezcla de ensayo (N_a) todo expresado en logaritmo.

Reducción de la concentración bacteriana (Log R)				
Microorganismo de ensayo	Concentración del producto (%)	Tiempo de contacto (min)		
		5 min	10 min	15min
<i>P. aeruginosa</i>	10%	< 5	< 5	< 5
	15%	< 5	< 5	5,1
	20%	< 5	< 5	7,1
<i>S. aureus</i>	10%	< 5	5,1	5,2
	15%	< 5	5,2	5,4
	20%	< 5	5,2	5,5
<i>E. hirae</i>	10%	< 5	< 5	< 5
	15%	< 5	< 5	5,2
	20%	< 5	< 5	5,4
<i>E. coli</i>	10%	< 5	5,3	5,1
	15%	5,3	5,4	5,3
	20%	6,8	5,3	5,4

Tabla 6. Actividad fungicida y levuricida del desinfectante de extractos naturales a los tiempos 5min, 10min, 15min y las concentraciones 2,5%, 5%, 10% estipulados para *A. niger* y *C. albicans* con una reducción logarítmica mayor o igual a 4 : La reducción logarítmica es determinada por el número de células por ml en las mezclas de ensayo al comienzo del tiempo contado (N_0) (la décima parte de la media aritmética ponderada de las mezclas debido a la dilución por la adición del producto y de las sustancias interferentes) menos el número de supervivientes por ml en la mezcla de ensayo (N_a) todo expresado en logaritmo.

Reducción de la concentración fúngica y levuricida (Log R)				
Microorganismo de ensayo	Concentración del producto (%)	Tiempo de contacto (min)		
		5 min	10 min	15min
<i>C. albicans</i>	2,5%	< 3	< 3	< 3
	5%	< 3	< 3	< 3
	10%	4,2	4,5	5,2
<i>A. niger</i>	2,5%	< 3	< 3	< 3
	5%	< 3	< 3	< 3
	10%	4,8	5,5	6,8

La ficha técnica del desinfectante de extractos naturales recomienda su aplicación a 0,5, 1,25 y 2,5% [10] las cuales se ensayaron con *E. coli* y *C. albicans*. Los resultados obtenidos muestran que a estas concentraciones, el desinfectante no cumple con los límites básicos establecidos en la NTC 5150 y 5817 (Tabla 1) aplicadas a estos microorganismos (Tabla 3 y 4) y por lo tanto, tampoco cumple con la guía de uso que ofrece la ficha técnica del desinfectante. Esto puede deberse a que el tiempo de contacto fue insuficiente para la eliminación del microorganismo de prueba. Dado que el fabricante no establece un tiempo de contacto para las diferentes concentraciones y llevar a que se vea afectada la eficacia del desinfectante. A partir de estos resultados se decidió realizar ensayos a concentraciones mayores para poder determinar la concentración mínima inhibitoria en cual el desinfectante cumpla con una reducción de al menos 5 UL para las cepas bacterianas y 4 UL para las cepas fúngicas como lo establecen las NTC respectivamente.

Aunque no se cumplió con las concentraciones establecidas por la ficha técnica, se pudo comprobar que al aumentar la concentración, el desinfectante resulta ser efectivo. Partiendo de la composición del desinfectante, al tener gran variedad de extractos naturales, en especial cítricos, se ha demostrado que muchos de estos extractos tienen gran capacidad antifúngica debido a su alta concentración de metabolitos, como lo son los fenoles y terpenos que en concentraciones altas tienen la capacidad de aumentar la concentración de peróxidos lipídicos en el interior de la célula provocando su muerte, por esta razón tienen un mejor impacto en los hongos que en las bacterias [20].

Las industrias e instituciones necesitan una gran cantidad de desinfectantes para poder realizar los procesos de limpieza y desinfección adecuados en todas sus instalaciones en un tiempo mínimo, por esto, estos sitios requieren de productos que sean económicamente rentables, permitiendo su uso a bajas concentraciones para no tener pérdidas significativas. Al tener que usar este desinfectante en concentraciones altas del 15% para la inhibición de todos los microorganismos (siendo 15% para las bacterias y 10% para hongos), no se recomienda su uso en industrias e

instituciones, ya que tendrían que usar una gran cantidad para limpiar una superficie contaminada, en comparación con otros desinfectantes. Este producto es idóneo para la limpieza del hogar o de lugares en los que el área a desinfectar no sea tan extensa.

3.5 Determinación de la actividad antimicrobiana del desinfectante de extractos naturales bajo condiciones sucias

Para la determinación de la actividad antimicrobiana en condiciones sucias, se utilizó como sustancia interferente leche en polvo y glucosa tomando en cuenta lo establecido en la NTC 5817. Los microorganismos de ensayo fueron *P. aeruginosa* ATCC 15442 y *C. albicans* ATCC 10231 como microorganismos obligatorios. Los aislados de una bacteria ácido láctica y una ácido acética, obtenidos del mosto de caña de azúcar de una industria azucarera del Valle del Cauca, fueron ensayados como microorganismos de ambientes industriales. Como modelo de microorganismos presentes en ambientes institucionales, se tomaron dos levaduras de género no identificado, aisladas del Laboratorio de Microbiología y de la superficie de una cafetería de la Universidad Santiago de Cali.

Los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana del desinfectante bajo condiciones sucias cumplieron con las condiciones de reducción de la carga microbiana. Estos resultados se presentan en las tablas 7 y 8, los cuales se ven reflejados por la reducción logarítmica del crecimiento (Log R) de los microorganismos de ensayo.

Las unidades logarítmicas requeridas por la norma NTC 5150 para la cepa bacteriana son igual o mayores a 5, en la cual *P. aeruginosa* presentó unos valores de Log R por encima de 5 siendo estos resultados positivos para este microorganismo (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de extractos naturales bajo condiciones sucias con *P. aeruginosa*. Como sustancia interferente se utilizó leche en polvo y glucosa. Los resultados se presentan en unidades logarítmicas. Se realizó a la concentración y tiempo recomendado para el uso del desinfectante (15% a 15 min).

Sustancia interferente	Log N ₀	Log N _a	Log R (N ₀ - N _a)
Leche en polvo	7,6	2,1	5,5
Glucosa	7,7	1,9	5,8

Al igual que la cepa bacteriana, la fúngica cumplió con las unidades requeridas por la norma NTC 5817, en donde los valores deben ser igual o mayores a 4 y *C. albicans* presentó unos valores de Log R por encima de 4 (Tabla 8). Con estos resultados se pudo determinar que las sustancias interferentes ensayadas no afectan en el crecimiento de estas cepas, ya que al ponerlas en contacto con los microorganismos por un tiempo determinado de 2 min, estas permiten que continúe con el adecuado crecimiento.

Tabla 8. Actividad antimicrobiana de extractos naturales bajo condiciones sucias con *C. albicans*. Como sustancia interferente se utilizó leche en polvo y glucosa. Los resultados se presentan en unidades logarítmicas. Se realizó a la concentración y tiempo recomendado para el uso del desinfectante (10% a 5 min).

Sustancia interferente	Log N ₀	Log Na	Log R (N ₀ - Na)
Leche en polvo	6,3	2,0	4,3
Glucosa	6,2	1,4	4,8

A partir de estos datos se tomaron cepas bacterianas de la industria azucarera y fúngicas de una institución educativa, las cuales se ensayaron con un tiempo de contacto de 15 min para las cepas bacterianas y 5 min para las cepas fúngicas y con la concentración más eficaz del desinfectante, siendo 15% para las cepas bacterianas y 10% para las fúngicas. Para este ensayo se utilizó una bacteria ácido láctica y otra ácido acética, las cuales se probaron en condiciones limpias (Tabla 9). Adicionalmente, se utilizaron dos levaduras silvestres aisladas en áreas de los laboratorios y de las superficies de puestos de comida rápida de la Universidad Santiago de Cali (Tabla 10).

Tabla 9. Actividad bactericida del desinfectante de extractos naturales en cepas ácido lácticas (BAL) y ácido acéticas (BAA) aisladas de la industria azucarera, usando el tiempo (15min) y la concentración (15%) más efectiva presente en los resultados de la tabla 5.

Microorganismo industrial	Log N ₀	Log Na	Log R (N ₀ - Na)
BAL	7,2	0	7,2
BAA	7,0	0	7,0

Tabla 10. Actividad levuricida del desinfectante de extractos naturales en cepas aisladas de la zona de restaurantes (levadura 1) y del laboratorio de microbiología (levadura 2) de la Universidad Santiago de Cali usando el tiempo (5min) y la concentración (10%) más efectiva presente en los resultados de la tabla 6.

Microorganismo ambiental	Log N ₀	Log Na	Log R (N ₀ - Na)
Levadura 1	6,2	2,2	4,8
Levadura 2	6,2	3,4	4,0

Se utilizó leche en polvo como sustancias interferentes, pues es un alimento común y de consumo masivo. Tiene gran variedad de compuestos como: ácidos grasos, proteínas y carbohidratos, los cuales se pueden encontrar en industrias de alimentos e instituciones donde se consumen productos alimenticios. También se utilizó la glucosa, ya que es un monosacárido que contiene 6 átomos de carbono, se encuentra casi en todos los alimentos y es primordial para la producción de energía en todos los seres vivos.

En el caso de las bacterias ácido láctica y ácido acética, se obtuvo como resultado un conteo de colonias igual a cero en el número de supervivientes por mililitro en la mezcla de ensayo (Na), presentando una reducción logarítmica mayor a las 5 unidades requeridas (Tabla 9). Esto nos

permitió determinar que el desinfectante a una concentración de 15% y a un tiempo de contacto de 15 min, tiene la capacidad de eliminar este tipo de microorganismos, convirtiéndose en una opción para la limpieza y desinfección en la industria azucarera, y al mismo tiempo, disminuyendo su impacto medioambiental.

Por otro lado, las levaduras ambientales fueron evaluadas al tiempo y la concentración recomendada (5 min al 10%). La levadura ambiental 1 presentó una reducción logarítmica del crecimiento de 4,8 unidades. Al ser una levadura aislada del boulevard de la Universidad Santiago de Cali, se encuentra en un lugar donde se manipula gran cantidad de alimentos, siendo un ambiente estable con gran cantidad de nutrientes, fáciles de adquirir. A diferencia de la levadura 1, el aislado número 2 que presento presentó una reducción logarítmica de 4,0 unidades. Al haber sido aislada en el laboratorio de microbiología, es posible que este microorganismo haya presentado alguna resistencia a los diferentes desinfectantes utilizados en este recinto por presión selectiva, ya que estos laboratorios son desinfectados rutinariamente para tener disponible una zona de trabajo estéril.

4. CONCLUSIONES

El extracto de levadura a concentraciones de 100 mg/ml, no presenta toxicidad para ninguno de los microorganismos ensayados. Además, se presenta como un potente neutralizante para desinfectantes a base de extractos naturales.

Los resultados de la actividad bactericida y fungicida de los aislados ambientales y las cepas ATCC ensayadas según las NTC fueron muy similares, lo cual pone de manifiesto la eficacia y confiabilidad de las normas en la evaluación de desinfectantes.

Los desinfectantes a base de productos naturales se presentan como una alternativa eco-amigable que puede ser explotada para minimizar el riesgo ambiental que producen los desinfectantes a base de productos sintéticos. Sin embargo, se debe aumentar su potencial antimicrobiano para que sean económicamente viables y puedan competir con los desinfectantes químicos comerciales.

5. AGRADECIMIENTOS

A la universidad Santiago de Cali por la aprobación de este proyecto y por brindarnos los medios para realizar toda la parte experimental de este trabajo. Al Dr. Carlos Andrés Aranaga Arias por liderar todo el proceso de dicho proyecto. A Protécnica Ingeniería S.A.S por brindarnos todas las muestras para realizar los experimentos nuestro trabajo de grado. Este proyecto fue financiado por el proyecto DGI No. 934-621118-49.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] "LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE EQUIPOS Y SUPERFICIES AMBIENTALES EN INSTITUCIONES PRESTADORAS DE SERVICIOS DE SALUD. SECRETARÍA DISTRITAL DE SALUD DIRECCIÓN DE SALUD PÚBLICA". (2011).
- [2] Skinner, K., & Leathers, T. "*Contaminantes bacterianos de la producción de etanol como combustible*". J. Industrial Microbiol. Biotechnol (2004).
- [3] Sossa Urrego, D. P., González, L. M., & Vanegas, M. c. "Aislamiento e identificación de Lactobacillus contaminantes en una planta colombiana de fermentación alcohólica". *U.D.C.A actualidad y divulgación científica*, 65 (2009).
- [4] Bayrock, W., & Ingledew, W. "*Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture*". USA (2004).
- [5] Glazer, A., & Nikaido, H. (1998). "*Biología microbiana: fundamentos de la microbiología aplicada*". USA: W.H. Freeman & Co.
- [6] Núñez Jiménez, O. "*Control microbiológico en caña y tandem. Resultados en ingenios de guatemala*". Guatemala: OPTIMIZA (2017).
- [7] CCOO-Aragón. "Limpiezas sin tóxicos. Se puede limpiar y desinfectar sin dañar tu salud y el medio ambiente. Breve guía Riesgos y alternativas a las sustancias químicas peligrosas". Zaragoza (2011).
- [8] Alonso, S., Caicedo, P., Hidalgo, H., Mojica, B., Rodríguez C., Rodríguez, E. "Guías para la prevención, control y vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias. Uso de desinfectantes". Secretaría Distrital de Salud de Bogotá D.C. (2004).
- [9] OZONOFUTUR. "Los productos de limpieza contaminan la salud y el medio ambiente". (2017).
- [10] "PROCIDE BIO C, Biocida Natural y Biodegradable. Ficha técnica". Yumbo, Colombia. Protécnica Ingeniería, especialidades químicas (2016).
- [11] "NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 5150. ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES QUÍMICOS. ACTIVIDAD BACTERICIDA BÁSICA. MÉTODO DE PRUEBA Y REQUISITOS (FASE 1)". ICONTEC. (2003).
- [12] "NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 5817. ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES QUÍMICOS. ENSAYO CUANTITATIVO DE SUSPENSIÓN PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA O LEVURICIDA DE LOS ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES QUÍMICOS UTILIZADOS EN EL ÁREA ALIMENTARIA, INDUSTRIAL, DOMÉSTICA E INSTITUCIONAL. MÉTODO DE ENSAYO Y REQUISITOS (FASE 2, ETAPA 1)". ICONTEC. (2010).
- [13] Díaz, N., Bárcena J., Fernández E., Galván A., Jorrín J., Peinado J., Meléndez T., Túnez I. "Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas". Córdoba. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
- [14] Palacios, J., Hernández, L., Díaz, J., Peña, N., Arévalo, N. "Evaluación del método dilución neutralización aplicado a un desinfectante según la Norma Técnica Colombiana 5473 de 2007". Bogotá, D.C, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. Grupo de biotecnología ambiental e industrial (GBAI). Departamento de Microbiología, facultad de ciencias (2012).

- [15] M. A. Olivares Cruz., A. López Malo "Potencial antimicrobiano de mezclas que incluyen aceites esenciales o sus componentes en fase vapor" Universidad de las Américas Puebla C. P. 72810. México (2013) 78-76
- [16] Argote, F., Suárez, J., Tobar, E., Pérez, A., Hurtado, M., Delgado, J "Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* BIOTECNOLOGÍA EN EL SECTOR AGROPECUARIO Y AGROINDUSTRIAL., 29 de agosto de 2017,.. Universidad de Nariño.
- [17] MCD LAB, S.A. de C.D. "Especificaciones extracto de levadura". Tlalnepantla, Edo. de México. Blv. Centro Industrial.
- [18] Otero, Miguel A., Cabello, Agustín J., "Obtención de extracto de levadura a partir de residuo de extracción alcalina de ácido ribonucleico de *Candida utilis*". ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar , vol 4, núm, 2 mayo- agosto, 2010 pp 16-20. Ciudad de la Habana, Cuba.
- [19] Int J Food Microbiol. 2004 Jan 1;90(1):51-61. Survival of acid-adapted or nonadapted *Escherichia coli* O157:H7 in apple wounds and surrounding tissue following chemical treatments and storage. Stopforth JD1, Ikeda JS, Kendall PA, Sofos JN.
- [20] Dianella Iglesias , Katia Ojito-Ramos , Claudia Linares Rivero y Orelvis Portal..., "Actividad antifúngica in vitro de extractos de hojas de Citrus spp. frente a *Stemphyllium solani*" Vol.44, No.3, julio-septiembre, 5-12, 2017 CE: 0117 CF: cag013172130 Revista Centro Agrícola Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas.