



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA
EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA INGENIERÍA EN ALIMENTOS



Determinación de la eficiencia y efectividad de un sanitizante en base a un tensioactivo de origen microbiano, sobre diferentes matrices alimentarias.

Trabajo de titulación, modalidad Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

El estudio forma parte del Proyecto de Investigación “Formulación de biosanitizantes a partir de tensioactivos microbianos para su aplicación en la Industria de Alimentos” CEDIA-CEPRAXIII, 2019, aprobado mediante Resolución 1357-CU-P-2019 por el Honorable Consejo Universitario de la Universidad Técnica de Ambato.

Autor: Rosario Guadalupe Vaca Alarcón.

Tutor: Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía.

Ambato – Ecuador

Septiembre 2020

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de ese Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 17 de Agosto de 2020

Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I. 180414808-6

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Rosario Guadalupe Vaca Alarcón, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniería en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Rosario Guadalupe Vaca Alarcón

C.I. 055025353-8

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban que el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria

C.I. 1802142461

Dr. David Andrés Terán Mera

C.I. 1716569726

Ambato, 14 de Septiembre de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi trabajo de titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Rosario Guadalupe Vaca Alarcón

C.I. 055025353-82W16GR7

AUTORA

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios y a la Virgen por haberme dado la vida y haberme permitido culminar mi carrera profesional.

A mis padres Josefina Alarcón y Miguel Vaca quienes fueron el motor principal para seguir adelante y no darme por vencida, quienes con su amor, apoyo, consejos y esfuerzo incondicional siempre me dieron ánimo para seguir adelante y confiaron en mí.

A mis hermanos Gustavo y Diego, por su tiempo y apoyo incondicional brindado en toda mi etapa universitaria, por estar conmigo en todo momento.

A mi familia por su ayuda en todo este tiempo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres por su apoyo incondicional, sin ellos no hubiese sido posible, por toda su paciencia, confianza y el amor que me tienen.

A mi tía Beatriz que es como mi segunda madre, muchas gracias por su apoyo durante mi proceso de formación universitaria.

A mis hermanos por brindarme su tiempo y consejos para seguir adelante.

A mis profesores especialmente a la Dra. Liliana Cerda quién es mi tutora y al Dr. David Terán gracias por el apoyo en aquellos momentos difíciles, por su paciencia, tiempos y por todos sus conocimientos compartidos, gracias a ellos pude culminar con mi trabajo de titulación.

A mis primas quienes estuvieron en todo momento apoyándome incondicionalmente.

A mis amigos con los que compartí muchos momentos agradables y con quienes nos apoyábamos mutuamente hasta lograr nuestro propósito.

ÍNDICE GENERAL DEL CONTENIDO

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL DEL CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE ECUACIONES	xiii
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
CAPITULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Antecedentes Investigativos.....	1
1.1.1 Sanitización	1
1.1.1.1 Clasificación de Sanitizantes.....	1

1.1.1.1.1	Alcoholes.....	1
1.1.1.1.2	Aldehídos.....	2
1.1.1.1.3	Cloro.....	2
1.1.1.1.4	Fenólicos	2
1.1.1.1.5	Quats.....	3
1.1.1.2	Usos de los sanitizantes	3
1.1.2	Tensioactivos.....	3
1.1.2.1	Clasificación de los tensioactivos.....	4
1.1.2.1.1	Tensioactivos Sintéticos	4
1.1.2.1.2	Tensioactivos No-Iónicos.....	6
1.1.2.2	Propiedades de los tensioactivos	7
1.1.3	Biotensioactivo	7
1.1.4	Fermentación o Biorreactores	9
1.1.4.1	Obtención del biotensioactivo	9
1.1.4.1.1	<i>Bacillus subtilis</i>	9
1.1.5	Inocuidad Alimentaria.....	11
1.1.5.1	Peligros de contaminación.....	11
1.1.5.1.1	Peligros físicos	11
1.1.5.1.2	Peligros químicos	11
1.1.5.1.3	Peligros biológicos	11
1.1.6	Matrices alimentarias tratadas en el estudio.....	12

1.1.6.1	Banana	12
1.1.6.2	Frutilla	12
1.1.6.3	Lechuga	13
1.1.7	Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA).....	14
1.1.7.1	Tipos de enfermedades.....	14
1.1.8	Microrganismos que afectan a las matrices alimentarias en estudio	15
1.1.8.1	<i>Bacillus cereus</i>	15
1.1.8.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.1.8.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	16
1.1.8.4	<i>Escherichia coli</i>	16
1.2	Objetivos	17
1.2.1	Objetivo General	17
1.2.2	Objetivos Específicos	17
CAPITULO II		18
METODOLOGÍA		18
2.1	Materiales y Métodos	18
2.2.1	Materiales, reactivos y equipos	18
2.2.2	Materiales	18
2.2.3	Reactivos	19
2.2.4	Equipos	19
2.2.5	Material biológico	20

2.3	Métodos.....	20
2.3.1	Aislamiento y crecimiento de las bacterias ATCC.	20
2.3.2	Estandarización de McFarland.	21
2.3.3	Obtención del biotensioactivo.	21
2.3.3.1	Material biológico	21
2.3.3.1.1	Siembra en placa del <i>Bacillus subtilis</i>	21
2.3.3.2	Medio empleado para la obtención del biotensioactivo	21
2.3.3.3	Siembra microbiana de <i>Bacillus subtilis</i> (biorreactor).....	22
2.3.3.4	Parámetros y condiciones de operación del biorreactor	22
2.3.3.5	Recuperación del biotensioactivo.....	24
2.3.4	Liofilización del biotensioactivo.	24
2.3.5	Efectividad de la formulación en placa.	24
2.3.5.1	Análisis estadístico.	25
2.3.5.2	Cinética de crecimiento bacteriano	25
2.3.6	Efectividad de la formulación en matrices alimentarias.....	25
CAPITULO III.....		26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		26
3.1	Análisis y discusión de los resultados.....	26
3.1.1	Estandarización de la curva McFarland	26
3.2	Producción del biotensioactivo	26
3.2.1	Requerimiento nutricional	27

3.3	Inhibición microbiana.	27
3.4	Efectividad del biosanitizante en matrices alimentarias	31
3.4.1	Inmersión.....	31
3.4.2	Aspersión.....	33
3.5	Cinética de crecimiento bacteriano de las cepas bacterianas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	35
CAPÍTULO IV.....		39
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		39
4.1	Conclusiones	39
4.2	Recomendaciones.....	39
BIBLIOGRAFÍA		41
ANEXOS		57

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 Anova multifactorial.....	30
FIGURA 2 Factores que afectan la inhibición bacteriana.....	31
FIGURA 3 Cinética de crecimiento bacteriano de <i>Escherichia coli</i>	36
FIGURA 4 Variación de la densidad óptica a través del tiempo de <i>E. coli</i>	37
FIGURA 5 Cinética de crecimiento bacteriano de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
FIGURA 6 Variación de la densidad óptica a través del tiempo de <i>Staphylococcus aureus</i>	38

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1 Cálculo de unidades formadoras de colonias	21
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Principales tensioactivos en la industria	6
Tabla 2 Clasificación de los biotensioactivos a partir de su grupo polar y del microorganismo que lo genera.	8
Tabla 3 Contaminación microbiana en matrices evaluada en matrices alimentarias	15
Tabla 4 Medio mineral para preparar el medio de cultivo del biotensioactivo.....	22
Tabla 5 Parámetros de operación del biorreactor para la obtención del biotensioactivo.	23
Tabla 6 Condiciones óptimas de operación del biorreactor.	23
Tabla 7 Halos de inhibición: efectividad de las diferentes concentraciones de biosanitizantes aplicadas a cuatro cepas bacterianas ATCC.....	28
Tabla 8 Reducción logarítmica obtenida mediante el método de inmersión.	32
Tabla 9 Cuantificación en la aplicación del biosanitizante por el método de inmersión en las matrices alimentarias	33
Tabla 10 Reducción logarítmica después de sanitizar las matrices	34
Tabla 11 Cuantificación en la aplicación del sanitizante por el método de aspersión en las matrices alimentarias	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Antibiograma de la muestra control de Escherichia coli.....	57
Anexo 2 Antibiograma de Bacillus cereus a una concentración del 60%	57
Anexo 3 Antibiograma de Staphylococcus aureus a una concentración del 60%	58
Anexo 4 Producción del biotensioactivo a partir de Bacillus subtilis DS23	58
Anexo 5 Liofilización del biotensioactivo.....	59

RESUMEN

Se determinó la eficiencia y efectividad del sanitizante en base a un biotensioactivo, se trabajó con tres formulaciones: desarrollada, control y el tensioactivo liofilizado que fue obtenido en el Laboratorio de Canje de Deuda de la Universidad Técnica de Ambato, se utilizaron como control cuatro cepas de bacterias patógenas *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Bacillus cereus* ATCC 1087 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, las tres primeras bacterias se sembraron en medio LB sólido (Luria Bertani) y la última cepa en Agar Nutritivo, las formulaciones se aplicaron sobre cajas Petri respectivamente con los medios de cultivo mencionados en concentraciones del 30 por ciento al 100 por ciento en escalas de 10, mediante el análisis estadístico se determinó la mejor formulación y la efectividad sobre dos de las cuatro bacterias, para lo cual resultó que la fórmula desarrollada es efectiva al 60 por ciento contra las cepas de *E. coli* y *S. aureus*, por lo tanto se evaluó su eficiencia y efectividad en tres matrices alimentarias banano, fresa y lechuga evaluada en tres tiempos 0, 5 y 10 min sin lavado empleando dos métodos de exposición spray y sumergido siendo éste el más óptimo, se realizó la curva de crecimiento bacteriano de *E. coli* y *S. aureus* mostrando así su eficacia al aplicar el sanitizante.

Palabras claves sugeridas:

Formulación, métodos de exposición, microorganismos, matrices alimentarias, concentración.

ABSTRACT

The efficiency and effectiveness of the sanitizer were determined based on a biotensive agent, for which three formulations were used: developed, control and the lyophilized surfactant in Canje de Deuda Laboratory of the Technical University of Ambato, four strains of pathogenic bacteria *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Bacillus cereus* ATCC 1087 and *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, the first three bacteria were seeded in solid LB medium (Luria Bertani) and the last strain in Nutrient Agar, the formulations were applied on Petri dishes respectively with the mentioned culture media in concentrations from 30 to 100 percent in scales of 10, through statistical analysis the best formulation and effectiveness on two of the four bacteria were determined, for which it turned out that the formula developed is 60 percent effective against the *E. coli* and *S. aureus* strains, therefore their efficiency and effectiveness were evaluated in three matrices banana, strawberry and lettuce food evaluated in three times 0, 5 and 10 min without washing using two methods of spray exposure and submerged being this the most optimal, the bacterial growth curve of *E. coli* and *S. aureus* was performed, thus showing its efficacy at apply the sanitizer.

Suggested keywords:

Formulation, exposure methods, microorganism, food matrices, concentration.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Investigativos

Actualmente en el Ecuador el consumo de frutas y hortalizas ha ido incrementando anualmente en un 12% y 4% respectivamente (CEPAL & FAO, 2018), los hábitos alimenticios de las personas han ido cambiando con la finalidad de mejorar su calidad de vida (Cámara, et. al., 2016).

La importancia del consumo de productos frescos e inocuos para el consumo humano ha sido un tema controversial, ya que influyen factores como el proceso de cosecha y pos-cosecha que sufren las frutas y hortalizas (Rincón & Martínez, 2015). La contaminación directa e indirecta de estos productos, incrementa la posibilidad de que las personas que lo consumen tengan problemas de salud como intoxicaciones producidas por la ingesta acumulada de microorganismos (Castañeda, et al., 2016).

1.1.1 Sanitización

Los sanitizantes se han utilizado desde hace mucho tiempo atrás a partir de los años 50; el proceso de sanitización consiste en eliminar la mayor parte de microorganismos existentes en las diferentes matrices alimentarias, proporcionando así alimentos inocuos y seguros (Félix, 2019). Los sanitizantes se aplican en las superficies de los alimentos donde hay mayor acumulación de agentes patógenos por el contacto directo con fuentes de contaminación especialmente de aire y agua (González et al., 2016).

1.1.1.1 Clasificación de Sanitizantes

1.1.1.1.1 Alcoholes

Es de uso más común, ya que tiene propiedades biocidas y germicidas eliminando un 95% de microorganismos, teniendo mejor respuesta cuando se mezcla con agua destilada (F. López et al., 2017).

Tiene una relación directamente proporcional con el número de carbonos existentes en el alcohol, ya que al aumentar éstos también aumenta su eficacia germicida y también su toxicidad (**Decurninge, 2014**).

1.1.1.1.2 Aldehídos

Este sanitizante es efectivo contra bacterias y hongos, debido a que tiene la propiedad de desnaturalizar proteínas y ácidos nucleicos mediante el proceso de reducción química afectando de esta manera la estructura de estos microorganismos, se usa principalmente para sanitizar superficies preferentemente de equipos (**Vignoli, 2006**).

1.1.1.1.3 Cloro

Ocupa el segundo lugar de los sanitizantes más utilizados en los hogares de las familias, por su rápido acceso y por su efecto bactericida, se lo aplica por lo general en superficies de muebles y utensilios, para eliminar la mayor cantidad de microorganismos (**F. López et al., 2017**). Son eficaces a baja temperatura y no dejan ningún residual (**Huertas, 2017**).

- **Solución de hipoclorito.** Se lo aplica para sanitizar superficies duras y para derrames de sangre que contengan el virus de hepatitis B en hospitales o en lugares de salud (**MSP, 2019**).
- **Cloramina.** Es más eficaz que la solución de hipoclorito, contiene alrededor del 25% de cloro y mantiene su eficacia bactericida por más tiempo respecto a los demás derivados del cloro. Sin embargo, las sustancias inorgánicas la inactivan (**Olmedo Sánchez, 2008**).
- **Dióxido de Cloro:** Su uso se dirige a la industria de papel para su blanqueamiento y en plantas de tratamientos de agua (**Medina, 2010**).
- **Dicloroisocianurato de Sodio (NaDCC):** Su uso se dirige a centros médicos, con mayor estabilidad están presentes en formas de pastillas de 2.5 y 5g (**Olmedo Sanchez, 2008**).

1.1.1.1.4 Fenólicos

Es el compuesto activo de varios sanitizantes es el más antiguo y corrosivo, que causa daño e irritaciones a la piel si no se tiene el cuidado adecuado, además emana vapores tóxicos que pueden afectar a la salud de las personas, además puede afectar las características sensoriales de alimentos (**Porras-Loaiza AP, 2009**).

1.1.1.1.5 Quats

También conocido como Compuesto de Amonio Cuaternario, son de carácter bactericida, fungicida y viricida; son incoloros e inodoros, no afectan a la salud de las personas, son solubles en agua y alcohol, tienen una mayor eficacia en medio alcalino y se usa en concentraciones de 0.25%. **(Diomedi et al., 2017)**.

1.1.1.2 Usos de los sanitizantes

Todos estos sanitizantes anteriormente mencionados, algunos son usados con la finalidad de reducir la carga microbiana, especialmente en la superficie de equipos y productos alimenticios **(Adonis et al., 2016)**. Estos actúan debido a que en la composición poseen actividad biocida y germicida, para poder atacar a bacterias, hongos y en algunos casos virus **(EACOSAN, 2015)**.

La elección de la solución de cada sanitizante a utilizar dependerá de la matriz en la que se vaya a aplicar, no todos los sanitizantes tienen un mismo espectro biocida, teniendo una relación directamente proporcional con la cantidad a utilizar, además de la superficie que se vaya a sanitizar previniendo así efectos secundarios por la mala utilización **(Para & Acero, 2011)**.

1.1.2 Tensioactivos

Los tensioactivos o también llamados surfactantes o surface active agents (agente activo de superficies) por sus siglas en inglés, actúan sobre la tensión superficial disminuyéndola en la interface que esté trabajando, permitiendo la unión de estas fases para obtener los resultados deseados **(Martín & Morales, 2016)**.

Los tensioactivos son moléculas activas que al colocarse en forma de capas mono moleculares absorbidas en la superficie entre la fase hidrófila e hidrófoba. Esta ubicación impide el tráfico de moléculas que van de la superficie al interior del líquido disminuyendo así su tensión superficial **(Narvaez, 2010)**.

Los surfactantes están formados por moléculas anfifílicas, que hacen referencia específicamente a la solubilidad de éstas moléculas **(L. Sánchez, 2006)**; poseen una parte hidrofóbica que puede contener compuestos hidrocarbonados o silanos que se encuentran en la cola mientras que en la parte hidrofílica tendrán grupos polares **(Isch, 2016)**.

Además de contrarrestar la tensión superficial, los surfactantes forman agregados coloidales, en presencia de agua obteniendo así una mejor eficacia en la aplicación del mismo (**Sanz, 217 C.E.**). La mayoría de los surfactantes se los encuentra en estado líquido, solución, hojuelas y cristales (**Salager, 2015**).

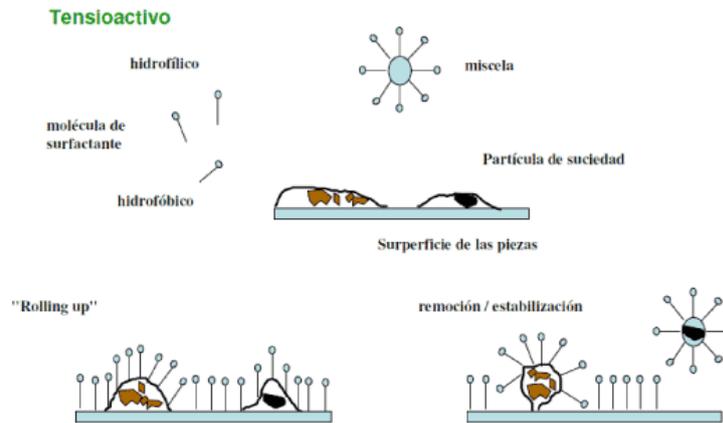


Figura 1. Los tensioactivos son moléculas anfifílicas con una parte hidrofílica y otra hidrofóbica que actúa sobre la membrana plasmática de las bacterias con la finalidad de eliminarlas; se encuentran preferiblemente en la interface de fluidos con diferentes grados de polaridad (**Jahan et al., 2020**).

1.1.2.1 Clasificación de los tensioactivos

Los tensioactivos se clasifican de acuerdo a su función y a su poder de disociación que presentan (naturaleza del grupo hidrófilo) cuando están en contacto con un electrolito y por sus propiedades fisicoquímicas (**Mariano, 2015**).

1.1.2.1.1 Tensioactivos Sintéticos

1.1.2.1.1.1 Tensioactivos Aniónicos

Este tipo de tensioactivos representan alrededor del 55% del total que se producen en el año en todo el mundo. Cuando están presentes en una solución se ionizan produciendo un ion tensioactivo con una carga negativa, los cationes que se asocian a los grupos polares, por lo general son sodio y potasio los cuales incrementan la solubilidad en agua de la estructura hidrofílica, mientras tanto calcio, bario y magnesio incrementan la solubilidad en aceite (**Rodriguez & Mejia, 2002**).

Algunos de los grupos polares que se encuentran en los tensioactivos aniónicos son:

- **Carboxilato.** Presentan una cadena alquílica y un grupo amina, que le dan mayor estabilidad estructural (**Reagenti & Reagents, 2013**).
- **Sulfonatos.** Para tener este tipo de surfactantes se obtiene primeramente una cadena carbonada y posteriormente se lleva a cabo el proceso de sulfonación, siendo su principal función la solubilización de surfactantes (**Romero & Catañeda, 2018**).
- **Sulfatos.** Es el surfactante más antiguo, el más importante a nivel industrial y comercial es el alquilbencensulfonato que forma parte de los jabones y champúes, este tipo de tensioactivo actúa excelente como humectante, espumante y detergente, siendo su parte hidrofílica fácil de modificar (**Salager, 2015**).
- **Fosfatos.** El átomo de oxígeno adicional que contiene permite que sea más hidrofílico en comparación de los demás grupos polares (**Montes de Oca, 2017**).

1.1.2.1.1.2 Tensioactivos Catiónicos

Los tensioactivos que pertenecen a este grupo en su mayoría son compuestos nitrogenados del tipo sal amina grasa o de amonio cuaternario, tiene gran capacidad bactericida y actúa de manera eficaz sobre sustratos biológicos e inertes (carga negativa), sólo el 5% de tensioactivos son de este tipo (**Altmajer et al., 2011**). La estructura polar tiene una carga positiva que se une a un átomo de nitrógeno tipo amino siendo esto suficiente para obtener una estructura hidrofílica que permita la solubilización (**Diomedi et al., 2017**).

Para incrementar la solubilidad, la amina puede convertirse en un compuesto de amonio cuaternario al incrementar un metilo en su estructura. Se lo utiliza en producción industrial y uso doméstico, son compatibles con surfactantes no iónicos, a lo contrario de los surfactantes iónicos. Sin embargo, una desventaja es que éste surfactante es costoso (**Norman & Trombetta, 2007**).

1.1.2.1.1.3 Tensioactivos Anfóteros

Son aquellos que no tienen mayor importancia en la industria de elaboración de tensioactivos, por lo general los anfóteros depende del medio en que se encuentren, ya que puede ser básico o ácido ocasionando que sean aniónicos o catiónicos

respectivamente (Villareal, 2019). Cuando la solución que se está utilizando está en un pH cercano a 7, por lo general estos tensioactivos no generan espuma (Salager, 2015). No son solubles con compuestos orgánicos, pero la ventaja que tienen es que son compatibles con los demás tensioactivos mencionados, su uso principal se basa en la elaboración de shampoo (Rafael et al., 2017).

1.1.2.1.2 Tensioactivos No-Iónicos

Este tipo de tensioactivo no se ioniza, por lo que se considera que toda la molécula es un tensioactivo siendo compatible con los demás surfactantes, al no ionizarse no tiene gran poder de adsorción (Keller, 2019).

Tabla 1 Principales tensioactivos en la industria

Clase	Nombre Común	Acrónimo
Tensioactivos Aniónicos	Lineal alquilbenceno sulfonatos	LAS
	Alcanos sulfonatos secundarios	SAS
	Alcoholes éter sulfatos	AES
	Alcoholes sulfatos	AS
Tensioactivos no-iónicos	Alquilfenoles etoxilados	APE o APEO
	Nonilfenoles etoxilados	NPE o NPEO
	Octilfenoles etoxilados	OPE u OPEO
	Alcoholes etoxilados	AE o AEO
	Sales de amonio cuaternario	QAC
Tensoactivos catiónicos	Haluros de alquil trimetil amonio	TMAC
	Haluros de dialquil dimetil amonio	DMAC
	Cloruro de bidimetilamonio	DTDMAC
	Cloruro de dietil ester dimetil amonio	DEEDMAC

Fuente: (Ríos, 2012).

1.1.2.2 Propiedades de los tensioactivos

Las propiedades de cada uno de los tensioactivos dependen en gran medida de su estructura molecular, mediante la cual puede reducir la tensión superficial e interfacial. Asimismo, la formación de espuma también se ve influenciada por la estructura que muestran los diferentes surfactantes (**Ramirez, 2017**). A ciertas concentraciones las soluciones de tensioactivo forman agregados micelares que generalmente se lo conoce como Concentración Micelar Crítica (CMC), característica propia de cada surfactante (**J. Pereira, 2012**).

Los tres factores importantes que intervienen en la CMC es la repulsión que presentan entre cadenas hidrófobas, repulsión entre cadenas hidrófilas y la atracción de las fuerzas de Van der Waals entre cadenas hidrófobas (**Rodriguez, 2009**).

1.1.3 Biotensioactivo

El uso de biotensioactivos se ha vuelto un tema controversial en la sociedad, esto se debe a los usos en todos los ámbitos como industrial, farmacéutico, textil, cosméticos e incluso alimentario. Actualmente, los tensioactivos sintéticos son de gran uso en la sociedad con una producción alrededor de 22000 kg al año (**Jiménez Islas et al., 2010**). Con la desventaja que al utilizarlos se contamina el medio ambiente, ya que en su gran mayoría son tóxicos muchos de estos productos al estar principalmente en contacto con ojos, nariz y mucosa causan irritaciones a la piel (**Cardozo, 2016**). La obtención de tensioactivos a partir de microorganismos que pueden ser bacterias, hongos y levaduras ha ido incrementando de manera significativa en el mercado global, por lo que se espera que para el año 2020 haya un incremento de ventas de biosurfactantes hasta \$ 17.1 M (**Orellana, 2014**).

Los tensioactivos de origen biológico de igual manera presentan una parte hidrofílica que puede ser aminoácidos, péptidos aniónicos o catiónicos y carbohidratos, así mismo tienen una cadena hidrófoba que puede estar constituida por ácidos grasos saturados e insaturados. Sin embargo una desventaja que presentan estos tensioactivos es su alto costo de producción a gran escala (**Zaragoza, 2012**).

La clasificación de este tipo de biotensioactivos es muy variada dependen del:

Grupo polar

- **Glicolípidos:** Es el grupo predominante de estos biosurfactantes, son compuestos que se encuentran en la membrana celular, están constituidos por mono, di, tri y tetra sacáridos de azúcares (**Sancada, 2015**).
- **Lipoproteínas y lipopéptidos:** Es el segundo grupo de biosurfactantes, se relaciona con la actividad superficial en los que se coloque (**Cortez, 2016**).
- **Fosfolípidos:** Forman parte de la membrana celular, sus principales funciones son comunicación y transporte de nutrientes (**Torres & Durán, 2015**).
- **Ácidos grasos.** Al estar en soluciones forman bicapas de manera espontánea (**Pereira et al., 2019**).

Peso molecular

- **Bajo peso molecular.** Son capaces de reducir la tensión superficial del agua de 25 a 30mN/m entre estos están glicolípidos, fosfolípidos y lipopéptidos, muestran una alta actividad biológica (**Raymundo et al., 2001**).
- **Alto peso molecular:** Contienen un CMC más alto que los de bajo peso molecular, sin embargo no son capaces de reducir la tensión superficial por debajo de 35 a 40 mN/m, su función principal es actuar como bioemulsionantes es decir estabiliza emulsiones (**Aranberri et al., 2006**).

Tabla 2 Clasificación de los biotensoactivos a partir de su grupo polar y del microorganismo que lo genera.

	Tensioactivo	Microorganismo
Glucolípidos	Ramnolípidos	<i>Pseudomonas</i> spp.
	Trealosalípidos	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i>
	Soforosalípidos	<i>Candida</i> spp.
	Manosileritolípidos	<i>Candida antarctica</i>
Lipopéptidos y	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>
	Iturina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>
Lipoproteínas	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Liquenisina	<i>Bacillus licheniformis</i>
Fosfolípidos y ácidos grasos	Ácidos	<i>Acinetobacter</i> sp.
	corynomicólicos	<i>Corynebacterium lepus</i>

Fuente: (Orellana, 2014)

1.1.4 Fermentación o Biorreactores

Es un equipo en el cual se realizan procesos fermentativos en los que intervienen microorganismos o sustancias bioquímicamente activas, el biorreactor es capaz de mantener los requerimientos necesarios para el crecimiento y desarrollo de los compuestos biológicos (**James & Zimmerman, 2014**).

El biorreactor permite tener un medio uniforme en todo el sistema fermentativo, proporcionando de esta manera fuentes de carbono y energía que faciliten el desarrollo del producto final, que por lo general es una biomasa y compuestos carbónicos que no afectan en gran medida al medio ambiente, por lo que son biodegradables (**Brand, 2008**).

Estos fermentadores tienen modos de operación: en forma discontinua (batch), continua (cultivo continuo) o semi continua (batch alimentado), siendo el más utilizado el primero, por su uso que no requiere mayor costo por las cantidades empleada en esta producción (**Acosta & Lavín, 2019**).

1.1.4.1 Obtención del biotensioactivo

Por lo general se utilizan medios de cultivos de microorganismos los más comunes son las bacterias, por su genoma que presentan para la obtención de los diferentes productos con actividad biocida (**Sanchez et al., 2002**).

1.1.4.1.1 *Bacillus subtilis*

Este microorganismo es una bacteria Gram Positiva que pertenece a la familia *Bacillaceae*, este género ha presentado gran variedad de investigaciones debido a los cambios que presenta su genética, existiendo más de 200 especies de Bacilos, con una movilidad flagelar y tamaño variable que oscila entre 0,5 a 10 μm (**Rooney et al., 2009**).

Las características principales de esta bacteria es que son quimio heterótrofos, producen esporas, siendo estas resistentes a los cambios bruscos en las condiciones ambientales en las que pueden habitar (**López, 2015**). Además son considerados como aerobios estrictos es decir necesitan de oxígeno para su supervivencia, algunos estudios revelan que también son anaerobios permitiendo la supervivencia mediante la fermentación de nitratos y por la fermentación de medios ricos en glucosa, proteína y piruvato (**Cobo, 2017**). Sin embargo presentan un potencial antagonista, esto se debe

a que ésta bacteria contiene enzimas líticas, antibióticos y también presenta actividad biocida (Cuervo, 2010; Méndez-Úbeda et al., 2018).

Bacillus subtilis es capaz de producir péptidos cuyo peso molecular es inferior a 2000 Da. Sin embargo tienen una excelente actividad anti-fúngica, antibacteriana, además de un alto valor biotecnológico mediante la producción de metabolitos secundarios (Lomeli González et al., 2011).

Estos microorganismos están formados por una capa de proteínas deshidratadas utilizando el ácido poli- β -hidroxibutírico respecto a los aerobios, mientras que para el caso de los anaerobios utilizan polisacáridos (Lomeli González et al., 2011; Villarreal et al., 2018).

- **Surfactina.** Es un metabolito secundario que se obtiene a partir de *B. subtilis* el cuál está formado por lipopéptidos cíclicos que contienen aminoácidos en su cola, tienen una actividad anti fúngica muy baja en comparación de la iturina y fengicina, pero un aspecto positivo que presenta es que tiene un gran poder surfactante en unión de estos dos metabolitos mencionados, también tienen actividad antitumoral e inclusive tiene un amplio espectro biocida (Coronel & Yáñez, 2018).
- **Iturina.** Es otro metabolito secundario producido por *B. subtilis*, los cuales están formados a partir de una estructura de 7 aminoácidos que forman el anillo peptídico y una parte hidrófoba que consta alrededor de 11 a 12 átomos de carbono (Martínez, 2018). Presentan una actividad biocida y anti-fúngica especialmente tienen una mejor acción sobre *Saccharomyces cerevisiae* además éste metabolito le da característica surfactante, siendo este menos potente que la surfactina. Sin embargo cuando actúan conjuntamente tienen un alto potencial. Una de sus principales funciones es actuar como biopesticida utilizado en la agricultura (Farfán, 2008).
- **Fengicina.** Al ser un metabolito secundario producto de *B. subtilis*, también está formado por un ciclo de péptidos que contienen 8 aminoácidos y la estructura hidrófoba contienen 14 átomos de carbono en su estructura (Castañeda & Sánchez, 2016). Su actividad anti fúngica se centra más su acción hacia hongos filamentosos mediante la interacción del esterol y

fosfolípidos, los cuáles son responsables del cambio de la estructura de la membrana fúngica (Fan et al., 2017).

1.1.5 Inocuidad Alimentaria

Las enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos no inocuos es un peligro para la salud de todos los consumidores, por ello la importancia de conocer sobre la inocuidad alimentaria (Matos et al., 2005). La inocuidad alimentaria es un sistema que se encarga de garantizar la seguridad de los alimentos es decir proveer alimentos inocuos, exento de peligros físico, químicos y biológicos, que sean nutritivos y agradables proporcionando de esta manera alimentos de calidad, aquellos que no causen daño cuando lo consuman (FAO, 2015b).

1.1.5.1 Peligros de contaminación.

1.1.5.1.1 Peligros físicos

Son aquellos objetos indeseables o extraños que se pueden encontrar en los diferentes alimentos causando lesiones o daños al consumidor. La gravedad de este agente especialmente depende de sus dimensiones; entre algunos peligros físicos tenemos fragmentos de vidrio, trozos de madera o metal, residuos de materiales de empaque o embalaje, que afectan las características sensoriales del producto final (Elika, 2013).

1.1.5.1.2 Peligros químicos

Este tipo de peligro se debe en gran medida a la presencia de compuestos químicos en los alimentos o en su gran mayoría por la presencia de trazas principalmente de plaguicidas o fertilizantes que contienen nitratos o nitritos, otro factor que afecta es el uso de químicos prohibidos en concentraciones altas, residuos de antibióticos que pueden ser contaminados de manera directa e indirecta afectando a la salud de los consumidores (Bejarano & Suárez, 2015; Bello, 2014).

1.1.5.1.3 Peligros biológicos

Los alimentos presentan diferentes tipos de peligros, pero el más importante es el biológico que está formado por microorganismos como bacterias, hongos y virus

(Salcido & Corona, 2010). Algunos de estos microorganismos pueden ser patógenos, que son aquellos que causan enfermedades provocando intoxicaciones alimentarias, el medio de contaminación con los virus es por medio de aguas contaminadas, en tanto que los hongos son los responsables principalmente de la micosis (FAO, 2009).

1.1.6 Matrices alimentarias tratadas en el estudio.

1.1.6.1 Banana

La banana es una planta que pertenece a la familia de las musáceas y a la clase de las monocotiledóneas, además fue una de las primeras plantas que se comercializó en todo el mundo (AEBE, 2016).

La producción de banano se da en zonas tropicales húmedas donde hay una fluctuación de temperatura entre 25 a 30 °C (Torres, 2012).

Después del proceso de postcosecha las bananas pueden presentar daños fisiológicos ocasionados por varios factores: clima, humedad, presencia de microorganismos, afectando las características físicas y sensoriales por lo que se procede a rosear la fruta con una solución de sulfato de aluminio y un fungicida para prevenir el daño de la corona (Borja, 2016)

Sin embargo, la manipulación de este producto en su cadena productiva tienen como resultado contaminación, centrándonos especialmente en la biológica, es por ello la importancia de utilizar un agente sanitizante que elimine la carga microbiana existente en la superficie del producto con la finalidad de obtener productos inocuos (Borja, 2016; León & Mejía, 2012; Taipe, 2017).

1.1.6.2 Frutilla

La frutilla es una planta herbácea, pertenece a la familia de las Rosáceas que proviene del género *Fragaria* que significa fresa, se deriva de *fragum* refiriéndose así a la fragancia de la fruta (Chiqui et al., 2010; Parra, 2018).

Para producir este tipo de fruta se requiere condiciones ambientales óptimas para su crecimiento, un factor importante es la temperatura que debe variar entre 16-20°C, esta planta puede crecer a una altura de 2 a 3 m, siendo la altura óptima de 90 cm, a pesar

que en su gran mayoría crecen hasta 25cm respecto al 90% del total de la producción **(Rivera et al., 2017)**.

La fresa es una fruta que por su alto valor nutritivo y por sus características físico químicas es de gran importancia, debido a las exigencias del mercado nacional e internacional **(Muñoz, 2011)**. El periodo de vida útil evaluado es de 3 a 4 días, iniciando desde el día que se produce, una ventaja de este cultivo es que se lo realiza dos veces por semana **(Adriano, 2017)**.

El consumo de frutas en nuestra dieta se ha vuelto un tema de gran importancia, ya que la carencia de frutas y hortaliza en la dieta pueden causar la aparición de enfermedades crónicas **(Cámara et al., 2016)**. Hay otras formas de consumir esta fruta, pueden expendirse de forma congelada, alrededor del 28% de productores lo hacen de esta manera **(Vizcaino, 2015)**.

1.1.6.3 Lechuga

La lechuga es una planta que pertenece al género *Fanérogama* a la familia de *Asteraceae* con más de 120 especies siendo la más producida en Ecuador *Lactuca sativa* **(Sádaba et al., 2017)**.

El cultivo de lechuga en Ecuador se da en zonas donde hay una precipitación de 400 a 600 mm, con una temperatura que oscila entre 12 y 18°C, en una área que tenga suficiente riego en presencia de un suelo arenoso o en cultivo hidropónicos que son los más recomendables para esta hortaliza, el ciclo del cultivo varía desde 100 a 150 días, llega a una altura aproximadamente de 60cm **(García & Romero, 2012)**. Por lo general estos cultivos se dan en forma de hidropónica lo que significa que no se utiliza el suelo para su cultivo, se emplea un sustrato constituido de material sólido, de esta manera se previene la contaminación de patógenos existentes en el suelo **(Sádaba et al., 2017; Vera & Méndez, 2018)**.

La lechuga es la cuarta hortaliza más consumido en Ecuador por su valor nutricional, contiene 94,8% de agua, 1,2% de proteína, el 0,2% de grasas, 2,9% hidratos de carbono **(Muñoz, 2018)**. Además contiene gran cantidad de minerales, vitaminas entre ellas la vitamina A que ayuda a prevenir la ceguera nocturna, ácido fólico que actúan como anticancerígeno, tiene propiedades medicinales beneficiando así al ser humano **(Jaramillo et al., 2014)**.

1.1.7 Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA).

Las ETAs se originan por la ingesta de alimentos contaminados por microorganismos que contienen toxinas que afectan a la salud de los consumidores, produciendo síntomas como dolor abdominal, diarreas, vómitos y fiebre. Entre el 15% y 70% de las diarreas que tienen los niños menores a 5 años se debe a intoxicaciones o infecciones provocadas por alimentos contaminados.

Alrededor del 70% de la población ha tenido infecciones o intoxicaciones, principalmente las personas de escasos recursos económicos, quienes compran productos a bajo costo donde no se ha comprobado la inocuidad y calidad, ocasionando así este tipo de enfermedades, que en muchos casos al no poder ser controlado se vuelve una pandemia ocasionando miles de muertes en todo el mundo.

1.1.7.1 Tipos de enfermedades.

En la Tabla 3 se detalla los principales microorganismos que podemos encontrar en diferentes matrices alimentarias afectando así las características físicoquímicas y sensoriales, ocasionando enfermedades como:

- **Intoxicaciones alimentarias.** Su principal causa es el consumo de alimentos contaminados por microorganismos patógenos que producen toxinas o por el exceso de carga bacteriana, en algunos casos este puede ser leve pero en otros puede ocasionar hasta la muerte dependiendo del grado de intoxicación (**Durán & Abajas, 2008**).
- **Infecciones alimentarias.** Se produce cuando se consumen alimentos contaminados de manera directa e indirectamente, éstos pueden tener bacterias, virus, parásitos u hongos, que han logrado permanecer en el alimento ya que allí tienen condiciones óptimas para su desarrollo, afectando la salud de los humanos (**Zúñiga & Caro, 2017**).

Tabla 3 Contaminación microbiana en matrices evaluada en matrices alimentarias

Microorganismo	Matriz Alimentaria
<i>Salmonella spp.</i>	Hamburguesa, chorizo, jugos, carne fresca, huevos, aguas residuales
<i>Escherichia coli</i>	Carne, huevos, ensaladas, frutas frescas, pescado fresco, carne y hortaliza
<i>Listeria monocytogenes</i>	Leche, queso, carne, hortaliza, cortes de carne, aves, pescado fresco
<i>Bacillus cereus</i>	Carne, leche, hortaliza, arroz, alimentos con almidón
<i>Staphylococcus aureus</i>	Carne y producto cárnicos, ensaladas, rellenos de panadería, leche y productos lácteos

Fuente: (FAO, 2015a; Rodríguez, 2009; Soto et al., 2016)

1.1.8 Microorganismos que afectan a las matrices alimentarias en estudio

1.1.8.1 *Bacillus cereus*

Es una bacteria Gram Positiva, anaerobia facultativa que tiene un amplio rango de temperatura para su crecimiento que oscila desde 4° hasta 48°C, con una temperatura óptima de 37°C (Pérez, 2012). Es un microorganismo patógeno que se encuentra en los alimentos, es peligroso ya que es una bacteria termo resistente, que produce esporas y flagelos que no se destruyen fácilmente, presentan resistencia a temperaturas de cocción y pasteurización. Se dice que la toxina que emite este microorganismo se ve inactivada a 121°C en 90 min (Castañeda & Sánchez, 2016).

Esta bacteria por lo general se lo encuentra en el suelo como saprofita ya que es un organismo heterótrofo que obtiene energía a partir del uso de materia orgánica, también se lo encuentra en el aire, agua, motivo por el cuál es fácil su transferencia hacia los alimentos, provocando contaminación en ellos que afecten al consumidor (Cortés et al., 2017).

1.1.8.2 *Staphylococcus aureus*

Son bacterias Gram Positivo, anaerobio facultativo su diámetro oscila entre 0,5 y 1,5 µm, se presenta en formas de racimos de color blanco o dorado, presentan la actividad de catalasa o coagulas provocando que este sea agresivo para su huésped cuando lo

infecta (**Alarcón et al., 2017**). Este microorganismo es común encontrarlos en agua, leche, agua potable y residual, siendo el principal foco de contaminación la mala manipulación de los alimentos, y la transferencia de los medios mencionados o superficies hacia las matrices alimentarias (**Zendejas et al., 2014**).

Es resistente a antibiótico ocasionando un gran problema para su cura cuando es causante de intoxicaciones, produce alrededor de 11 serotipos de enterotoxinas que son causantes de intoxicaciones alimentarias, teniendo un tiempo de incubación menor a 3 horas (**Herrera & Santos, 2015**).

1.1.8.3 Listeria monocytogenes

Es una bacteria anaerobia facultativa, Gram Positiva no esporulada, cultivos viejos presentan formas filamentosas de hasta 2 mm de longitud, la temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 30 y 37°C, aunque en algunos casos también puede crecer a 4°C notando su presencia en algunos días (**Flores et al., 2018; Mateus et al., 2017**). Entre las diferentes especies la más importante a nivel patológico es *L. monocytogenes* que causa enfermedades e intoxicaciones a las personas que lo consumen (**Mateus et al., 2017**).

Este microorganismo se encuentra en el suelo, aire, residuos orgánicos, materia vegetal en descomposición en los que crece como saprofito, alimentos frescos y congelados (**Oteo & Alós, 2009**). *L. monocytogenes* produce una toxina citolítica y hemolítica causando de esta manera enfermedades como la listeriosis que es una enfermedad que se obtiene por transmisión alimentaria, provocando enfermedades como la gastroenteritis (**Valero et al., 2019**).

1.1.8.4 Escherichia coli

Es una bacteria Gram Negativa, aerobio facultativo, no esporulados fermenta la lactosa y glucosa teniendo como producto un gas, es una bacteria mesófila que crece en rangos de temperatura entre 35 a 43°C, además también puede crecer hasta a 7°C con la diferencia que demorará su crecimiento (**Gibert, 2010**). Se lo encuentra principalmente en el tracto intestinal y en animales de sangre caliente, es muy común, hay cepas que son patógenas (**Kai et al., 2010**).

E. coli es sensible a temperaturas superiores a 70°C, por ello la importancia de que los alimentos que se vayan a consumir tenga un tratamiento térmico. para eliminar este

tipo de microorganismos (**Margall et al., 1997**). Algunas cepas son patógenos emitiendo la toxina shiga, que provoca intoxicaciones a los seres humanos, presentándose con dolores abdominales y diarreas (**Soto et al., 2016**).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

- Determinar la eficiencia y efectividad de un sanitizante en base a un tensoactivo de origen microbiano sobre diferentes matrices alimentarias.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Analizar la eficiencia de la formulación del biosanitizante en placa sobre bacterias patógenas.
- Analizar la cinética de crecimiento de las bacterias patógenas afectadas por el sanitizante.
- Analizar la eficiencia del biosanitizante en diferentes formas de aplicación de la formulación en matrices de productos alimenticio.

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales y Métodos

2.2.1 Materiales, reactivos y equipos

2.2.2 Materiales

- Vasos de precipitación 100, 250, 500, 1000mL
- Probetas 10, 100, 500, 1000mL
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Papel film
- Tubos Falcon de 50mL
- Film plástico
- Puntas para pipetas de 200 μ L, 1mL, 10mL
- Pipetas
- Micropipetas de volumen variable
- Balones de aforo
- Fundas ziploc
- Papel absorbente
- Papel industrial
- Hisopos
- Cajas Petri desechables y de vidrio
- Mechero
- Espátulas estériles
- Gradillas
- Tubos bacteriológicos
- Frascos de tapa azul
- Atomizador
- Guantes de nitrilo
- Mascarillas
- Rotuladores

- Masking

2.2.3 Reactivos

- LB agar
- Extracto de levadura
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Triptona
- Agar nutritivo
- Glicerol ($C_3H_8O_3$)
- D-glucosa ($C_6H_{12}O_6$)
- Nitrato de Sodio ($NaNO_3$)
- Fosfato disódico (Na_2HPO_4)
- Fosfato mono potásico (KH_2PO_4)
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- Sulfato de hierro heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)
- Cloruro de calcio ($CaCl_2$)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4)
- Butilglicol

2.2.4 Equipos

- Refrigerador (Lg).
- Ultra congelador (Binder)
- Autoclave (HIRAYAMA/HV-110).
- Incubadora (Isotherm).
- Balanza analítica (Adventurer Pro).
- Balanza analítica (Mettler Toledo XSE205 DualRange)
- pH metro de brazo (Thermo Scientific).
- Cámara de flujo laminar (OptiMAIR^R).
- Balanza Analítica (Mettler Tpoledo/Xpe 204).
- Espectofotómetro para placas (Fisher Scientific evolution/201).

- Biorreactor (Winpact SG/02 series)
- Estufa (Precisión-Thermo Scientific)
- Agitador incubador orbital (Shaker mini-Benchmarle).
- Micropipeta manual (Thermo Scientific, Dinamarca)
- Centrífuga (Rotina 380-Hettich Zentrifugen)
- Liofilizador (Labconco)
- Software estadístico

2.2.5 Material biológico

Se utilizó cepas de 4 bacterias *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Bacillus cereus* ATCC 10876 para probar la efectividad del sanitizante. Para la obtención del biotensioactivo se utilizó *Bacillus subtilis* DS23. Las cepas fueron proveídas por el banco de cepas del Centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador (CIBE), proporcionado por el Dr. Jonathan Coronel León y conservadas en el Laboratorio de Canje de Deuda de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología en un cultivo líquido con 20% de glicerol a -80°C.

2.3 Métodos

2.3.1 Aislamiento y crecimiento de las bacterias ATCC.

El medio de cultivo que se utilizó para las cepas de *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 y *Bacillus cereus* ATCC 10876 es LB líquido, mientras que para *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 se utilizó caldo nutritivo.

Se colocó 5mL de LB líquido en tubos bacteriológicos de 10mL previamente esterilizados, con un asa plástica estéril se inoculo el tubo con medio realizando movimientos circulares. Se incubó por 24 horas a 37°C con 150rpm. Se utilizó el mismo procedimiento para *L. monocytogenes* en caldo nutritivo con un tiempo de incubación de 48 horas a 150rpm.

Se tomó 100µL del medio de cultivo previamente sembrado y se inoculó en cajas Petri que contenían LB sólido para las tres cepas, para *L. monocytogenes* se utilizó como medio de cultivo agar nutritivo previamente esterilizado y vertido en cajas Petri, con una asa triangular estéril se dispersó el inóculo para tener una siembra microbiológica uniforme.

2.3.2 Estandarización de McFarland.

Con las bacterias previamente sembradas en medio líquido, se realizó diluciones seriadas hasta 1×10^{-7} , se sembró las últimas 4 diluciones con tres réplicas cada una. Se sembró en medio LB sólido, *L. monocytogenes* se sembró en agar nutritivo, previamente se autoclavó y se vertió en cajas Petri, posteriormente cuando el agar se solidificó se inoculó 100µL de cada bacteria y se incubó por 24 horas a 37°C.

Se realizó el recuento de microorganismos para obtener una concentración de 1.5 a 1.8×10^{-8} ufc/mL de las cuatro cepas bacterianas utilizando la ecuación 1.

Ecuación 1 Cálculo de unidades formadoras de colonias

$$\frac{Ufc}{mL} = \frac{Número\ de\ colonias \times FD}{V(mL)}$$

Dónde:

FD= Factor de dilución a la inversa

V= Volumen total sembrado

2.3.3 Obtención del biotensioactivo.

2.3.3.1 Material biológico

Se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* DS23, la cual se encuentra en el Laboratorio de Canje de Deuda de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, manteniéndola en glicerol al 20%.

2.3.3.1.1 Siembra en placa del *Bacillus subtilis*

Para mantener el cultivo microbiológico vivo, se sembró en medio LB sólido (Luria Bertani), previamente las cajas esterilizadas, posteriormente se inoculó 100 µL del medio líquido y se incubó a 24 horas con las cajas Petri invertidas.

2.3.3.2 Medio empleado para la obtención del biotensioactivo

El medio mineral que se utilizó se basa en el uso de compuestos inorgánicos para el cultivo del microorganismo en el biorreactor, la composición de este medio se detalla en la Tabla 4.

Se realizó una solución stock de CaCl₂ de 700mg/L, posteriormente se tomó 10µL y se añadió al medio mineral, omitiendo el peso del reactivo sólido por ser una cantidad efímera.

Tabla 4 Medio mineral para preparar el medio de cultivo del biotensioactivo

Medio Mineral	
Compuesto	Cantidad (g)
D-glucosa	10
Extracto de levadura	0,5
Nitrato de Sodio	4,25
Fosfato disódico	2,85
Fosfato mono potásico	2
Sulfato de mangnesio heptahidratado	0,105
Sulfato de hierro heptahidratado	0,005
Cloruro de calcio	0,0000035

Fuente: (Doménech & García, 2014).

2.3.3.3 Siembra microbiana de *Bacillus subtilis* (biorreactor).

Con la ayuda de una asa se tomó la bacteria y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500mL que contuvo 100mL de medio mineral, se incubó a 37°C a 150rpm por 24 horas, utilizando el shaker incubador.

Después de haber pasado el tiempo estimado, se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro teniendo como resultado un valor de 0,987 g/L que significa que es la biomasa que se produjo en el matraz, seguidamente se añadió e inóculo al biorreactor que contenía el medio mineral en un volumen de 4.5L y se puso en funcionamiento al equipo.

2.3.3.4 Parámetros y condiciones de operación del biorreactor

Para operar el biorreactor se emplearon los parámetros detallados en la Tabla 5.

Tabla 5 Parámetros de operación del biorreactor para la obtención del biotensioactivo.

Parámetro	Descripción
Temperatura	30°C
Tiempo de cultivo	24 horas
Tipo de agitador	Turbina rushton de seis palas
Número de agitadores	3
Numero de deflectores	3
Tipo de difusor de aire	difusor en anillo con poro de 1mm de diámetro
Tamaño de burbuja	2-10um
Control de pH	Automatizado, con soluciones de NaOH 0,35M y H2SO4 0,35M
Antiespumante	Butilglicol 10%

Para obtener un mejor rendimiento del tensioactivo de origen microbiano, se utilizó el biorreactor en sus condiciones óptimas de operación, que se señalan en la Tabla 6.

Tabla 6 Condiciones óptimas de operación del biorreactor.

Parámetro	Condiciones óptimas
pH	6,5
Temperatura	30°C
Velocidad de agitación	300rpm
Aireación	5vvm

Nota: vvm indica el volumen de aire sobre el volumen de cultivo por minuto (Robalino, 2020).

2.3.3.5 Recuperación del biotensioactivo.

Después de haber transcurrido las 24 horas del cultivo microbiológico de *Bacillus subtilis* DS23, se tomó alrededor de 45 mL en tubos Falcon de 50mL, se centrifugó a 4000rpm por 15 minutos con el objetivo de tener dos fases, una donde estará el pellet o biomasa y la otra que será el tensioactivo o sobrenadante.

Posteriormente todo el sobrenadante recuperado se colocó en vasos de precipitación, se midió el pH y se añadió HCl al 37%, hasta que el pH llegó a 2. Seguidamente se dejó en reposo por 24 horas a temperatura ambiente (18°C). Después que transcurrió este tiempo se gasificó el contenido de tensioactivo, se añadió NaOH al 35% con la finalidad de obtener la solución con un pH de 7.

2.3.4 Liofilización del biotensioactivo.

Previamente, se debe congelar el tensioactivo en el ultra congelador (-80°C), alrededor de 1 hora. Las muestras se colocaron en el liofilizador del laboratorio de Canje de Deuda, las cuales se quedaron ahí por 24 horas, hasta obtener una muestra liofilizada. Posteriormente, se colocó las muestras en la estufa para eliminar la humedad sobrante y obtener el tensioactivo sólido.

2.3.5 Efectividad de la formulación en placa.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMB) contra las cepas de *E. coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Bacillus cereus* ATCC 10876, para lo cual se preparó series de diluciones de los formulados en las siguientes concentraciones 30, 40, 50, 60 y 70%, se utilizó como control el antibiótico ampicilina al 50%.

En las cajas Petri esterilizadas previamente se vertió LB sólido, excepto la *L. monocytogenes* que se utilizó Agar Nutritivo. Se dividió a las cajas petri en 3 partes iguales, se perforó el agar, se sembró en las placas 100µL de las cepas bacterianas, posteriormente se agregó 20µL de las 3 formulaciones (desarrollada, control y tensioactivo) en las perforaciones, se incubó por 24horas a 37°C. Se realizó tres réplicas de cada concentración.

Después que ha transcurrido el tiempo mencionado, se midió la distancia del halo de inhibición de todas las réplicas realizadas.

2.3.5.1 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de los halos inhibidos se analizaron mediante el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI utilizando un diseño factorial de 5 factores para determinar la mejor concentración y cuál de los microorganismos tenía mayor inhibición frente a las formulaciones.

2.3.5.2 Cinética de crecimiento bacteriano

Mediante el análisis estadístico se tomó sólo los mejores tratamientos del halo de inhibición en este caso las bacterias fueron *S. aureus* y *E. coli*. Previamente se sembró el microorganismo en un matraz, 20mL utilizando como medio LB líquido con una colonia de cada cepa y se añadió 120mL del mismo medio puro al matraz de 250mL. Posteriormente se agitó y se midió la densidad óptica en el transcurso de cada hora, se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-5} y se sembró en cajas Petri en medio LB sólido con tres réplicas de cada dilución de las bacterias en cada hora de análisis.

2.3.6 Efectividad de la formulación en matrices alimentarias.

Se determinará la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de las formulaciones desarrolladas contra las cepas. *E. coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600. Sobre matrices alimentarias como la lechuga, banano y fresa, se realizarán dos métodos de exposición a los formulados (spray y sumergido), durante 5 y 10 minutos sin lavado (**Skowron et al. 2018; Pinheiro et al. 2018**). Estos ensayos serán realizados por triplicado.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los resultados

3.1.1 Estandarización de la curva McFarland

Se estandarizó las 4 bacterias al valor de McFarland (MF) que según **Donay et al. (2007)** este patrón contiene un estándar de 0.5 a 0.6 equivalente a MF de 1.5×10^8 células bacterianas por mL mediante estos datos se realiza las pruebas de sensibilidad antimicrobiana determinando así su efectividad contra un compuesto o antibiótico.

3.2 Producción del biotensioactivo

Para la obtención del biotensioactivo los microorganismos que se utilizó fue *Bacillus subtilis* proveídas por el CIBE. **Hee et al. (2011)** menciona que está formado por un lipopéptidos que tiene una cola de ácidos grasos con 8 aminoácidos y que contienen de 12 a 14 átomos de carbono evidenciando de esta manera la parte hidrofílica e hidrofóbica que deben tener los surfactantes.

Para la producción del biosanitizante se necesita de un sustrato que fue un carbohidrato en este caso la glucosa que se añadió al medio de cultivo, lo que permite la producción de péptidos, lipopéptidos y fosfolípidos, los cuales son metabolizados excepto los lipopéptidos que son aquellos que forman los tres componentes principales del biotensioactivo como son la surfactina, iturina y fengicina (**Donay et al., 2007; Hee et al., 2011**).

La surfactina tienen propiedades hemolíticas, antibacterianas, antivirales y anti fúngicas (**Sánchez, 2016**). Sin embargo inhibe la formación de biopelículas que se encuentran en otras bacterias al intervenir con la unión de las células bacteriana que se encuentran en la superficie de las matrices alimentarias (**Nagua, 2016**).

Hay tres especies de iturina que se producen en la producción del biosurfactante, entre ellas la del tipo A que es la más eficiente y más fuerte respecto a su actividad biocida, está conformada por residuos β -amino ácidos comprobando así la presencia de este compuesto en el tensioactivo por la cadena hidrófoba (**Lomeli González et al., 2011**). La fengicina principalmente tiene poder anti fúngico lo cual permitirá combatir este tipo de microorganismo con la producción de este tensioactivo (**Ariza & Sánchez, 2012**). Al actuar en conjunto estos tres componentes le dan ese poder fuerte biocida capaz de combatir contra patógenos como *S. aureus*, *E.coli*, *B. cereus* y *L. monocytogenes* y anti fúngico lo que asevera que inhibirá microorganismos que afecta la inocuidad productos alimenticios.

3.2.1 Requerimiento nutricional

Para que el microorganismos pueda reproducirse y obtener el producto deseado, es necesario que el medio en el que va a permanecer no exceda más del 5% de NaCl lo que coincide con la formulación empleada Tabla 4, sin embargo **Hee et al. (2011)** menciona que también puede crecer en condiciones salinas de hasta 7%. Además debe contar con fuentes carbonadas que actúan como aceptores de electrones para obtener energía y también lo usan en su carboxilación (**Javaheri et al., 2005**).

La presencia del medio mineral como fuente de aniones y cationes, siendo este último el más importante cabe mencionar que el ión potasio interviene en la activación de enzimas en el caso de las bacterias predomina la hidrolasa, el ión magnesio actúa como estabilizador y ayuda a la transferencia de grupos fosfatos, el hierro actúa como cofactor de las enzimas, y muchas bacterias tienen moléculas hidrófobas que captan este hierro (**Cobo, 2017**).

3.3 Inhibición microbiana.

Los resultados obtenidos respecto al halo de inhibición al realizarse por antibiogramas de las cuatro bacterias se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7 Halos de inhibición: efectividad de las diferentes concentraciones de biosanitizantes aplicadas a cuatro cepas bacterianas ATCC

<i>Bacillus Cereus</i>			
Concentración (%)	Tensoactivo (cm)	Desarrollada (cm)	Controlada (cm)
30	0,43	0,50	0,60
40	0,68	0,90	0,98
50	0,53	0,68	1,23
60	0,43	1,10	1,67
70	0,45	0,49	0,00
100	0,90	1,70	2,23
<i>Listeria monocytogenes</i>			
Concentración (%)	Tensoactivo (cm)	Desarrollada (cm)	Controlada (cm)
30	0,53	1,30	0,75
40	0,43	1,37	0,87
50	0,73	1,45	1,02
60	0,78	1,54	1,10
70	1,02	1,62	1,23
100	1,23	1,83	1,42
<i>Escherichia coli</i>			
Concentración (%)	Tensoactivo (cm)	Desarrollada (cm)	Controlada (cm)
30	0,53	0,80	0,70
40	0,63	0,90	0,88
50	0,60	0,93	0,97
60	0,77	1,00	1,05
70	0,72	1,13	1,23
100	0,90	1,40	1,47
<i>Staphylococcus aureus</i>			
Concentración (%)	Tensoactivo (cm)	Desarrollada (cm)	Controlada (cm)
30	0,80	1,37	1,33
40	0,93	1,50	1,63
50	1,02	1,70	1,92
60	1,10	1,93	2,00
70	1,20	2,30	2,20
100	1,33	2,70	2,77

Se utilizó la estandarización de McFarland, para los antibiogramas realizados con las cuatro cepas bacterianas. **Ulloa (2015)** menciona que son estándares de turbidez con

una densidad de 0.5 que equivale a 1.5×10^8 ufc/mL, experimentalmente la concentración que se obtuvo fue de 1.8×10^8 . Esta concentración principalmente se utiliza para la formación de antibiogramas, permitiendo conocer así la sensibilidad microbiana frente a antibióticos u otros compuestos que alteren su estructura (**Parente et al., 2015**).

Para determinar que un biosanitizante es efectivo su halo de inhibición respecto a bacterias Gram Positivas debe oscilar entre 28 a 32mm lo que se asemeja con los valores obtenidos experimentalmente como se observa en la Tabla 8 y para las Gram Negativas tendrá un halo de oscilación de 35 a 40 mm, experimentalmente el halo de inhibición de esta bacteria fue inferior ocasionándose por errores sistemáticos del analista (**Gutiérrez & Agudelo, 2009**).

Como se muestra los datos en la Tabla 8, la mayor distancia respecto a los halos de inhibición de los biosanitizantes aplicados se evidencia en las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, ambas bacterias son Gram Positivas sin embargo se realizó el análisis estadístico en el que intervinieron los factores que fueron los tipos de bacterias, la formulación y las diferentes concentraciones analizadas

Como se observa en la Figura 1, las bacterias que tienen una mejor tendencia son los factores A2 y A3 que corresponde a *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* respectivamente, sin embargo para el estudio de este biotensioactivo se decidió probar con *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, respecto al banano según **Taipe (2017)**, menciona que el microorganismo que presenta problemas en la cáscara de este alimento es *E. coli*, es por ello la importancia de eliminar este patógeno para que no ingrese a la parte comestible del fruto, el banano tiene una presión positiva que empuja el látex de la fruta hacia los tallos, permitiendo que la membrana se mantenga impermeable. Sin embargo, según bibliografía realizada respecto a los patógenos más comunes que se encuentran en la lechuga son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, y *Pseudomonas aeruginosa*, ya que se encuentran en mayor cantidades en los suelos (**Carrillo, 2016; Duan et al., 2017; Guentzel et al., 2008**).

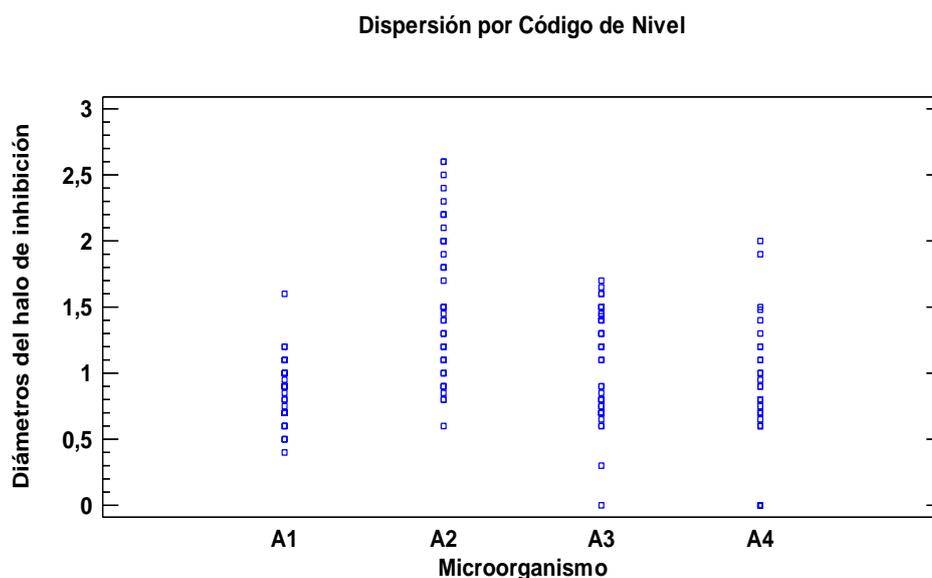


FIGURA 1 Anova multifactorial, en el eje x se muestran los microorganismos utilizados en el análisis donde A1, A2, A3, A4 son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* respectivamente, en relación con el diámetro inhibitorio dado por la acción del biosanitizante.

En la Figura 2 *S. aureus* no forma parte de la campana de Gauss, sin embargo estudios mencionan que éste microorganismo se encuentra en gran cantidad en frutas y verduras frescas afectando de esta manera su inocuidad (Castro del Campo et al., 2014; Y. Rodriguez, 2018).

Por otro lado *Bacillus cereus* también está fuera de esta campana Gaussiana, la formulación del biosanitizante contiene *Bacillus subtilis* DS23 al tener semejanza del 88% en su estructura celular, no afectará la membrana de este microorganismo, por lo cual su afectación no es significativa respecto a los demás halos de inhibición (Javaheri et al., 2005; Villareal, 2019).

ANOVA Gráfico para Diámetros del halo de inhibición

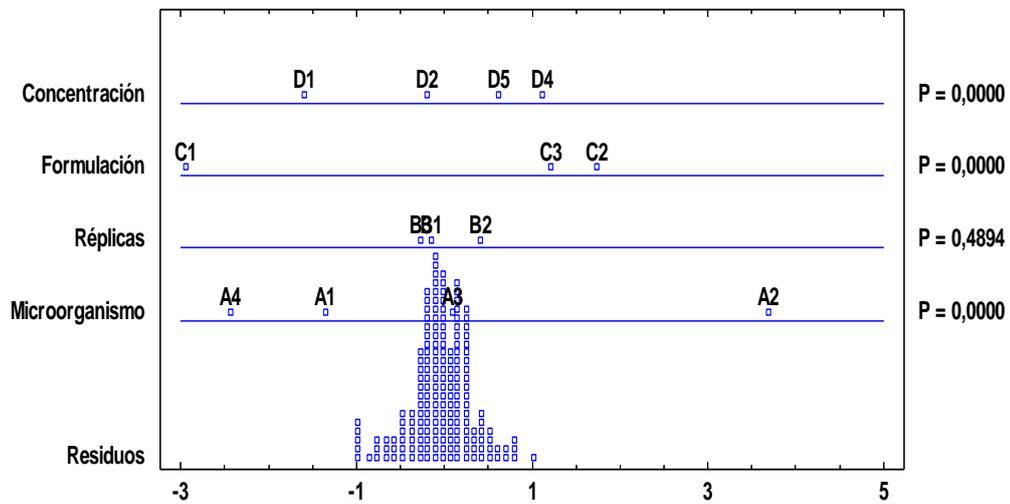


FIGURA 2 Factores que afectan la inhibición bacteriana

Los biotensioactivo presentan un índice de mortalidad alta respecto a las bacterias y hongos, esto ocurre en concentraciones altas y por su relación es bioestática (**Jiménez Islas et al., 2010**), por lo que la concentración óptima del uso del tensioactivo es del 60% de la formula desarrollada, como se muestra en la Tabla 8 con esta concentración se tuvo mejores resultados en relación al diámetro de los antibiogramas (halos de inhibición). Según **Alba & Araujo (2017)** menciona que al aplicar concentraciones superiores al 50% de sanitizantes altera la viabilidad de los microorganismos provocando una lisis celular o daños bioquímicos a la célula.

3.4 Efectividad del biosanitizante en matrices alimentarias

3.4.1 Inmersión.

El método que dio resultados favorables fue el de inmersión, éste método es más eficaz, debido a que todo el producto está en contacto directo con el biotensioactivo que se encuentra concentrado al 60%, permitiendo que incrustaciones o bacterias adheridas sean atacadas por la presencia del biotensioactivo, su estructura celular se ve afectada especialmente la membrana extracelular permitiendo el ingreso del tensioactivo que destruirá el ADN del patógeno, lo cual da como resultado la muerte (**Novak et al., 2015; Serra, 2017**).

Sin embargo la membrana citoplasmática interna puede presentar resistencia al estar compuesta por lipoproteínas previniendo de esta manera la difusión pasiva de las moléculas hidrofílicas del sanitizante, lo cual no facilitará el proceso de lisis bacteriana (Gutiérrez & Agudelo, 2009).

En la Tabla 8 se detallan los resultados de la reducción logarítmica, se observa que los mejores resultados sobre los microorganismo presentes en las matrices alimentarias suceden cuando éstas se encuentran en contacto con el sanitizante durante 10 min, lo que significa que la matriz alimenticia tuvo mayor tiempo de contacto con el sanitizante llegando a una eficiencia del 100% en diluciones realizadas de 10^{-5} donde los ufc/mL fueron de cero.

El mayor grado de reducción se evidencia en el tiempo de 10 min, especialmente se observa un mayor grado respecto a la fresa y lechuga, siendo estas matrices las más complejas (Fino & Kniel, 2008). La lechuga se siembra en el suelo a una profundidad de 50 a 60cm, con una semejanza de sembrío de la fresa, ya que cuando se embebe con agua que es la fuente principal de los patógenos en estudio, provocan daños físicos afectando la inocuidad del producto (INIA, 2017b, 2017a). Cuando se aplica procesos de saneamiento debe reducirse ese número a un valor de 10^3 en las matrices alimentarias para considerar como seguro e inocuo.

Tabla 8 Reducción logarítmica obtenida mediante el método de inmersión.

Matriz Alimentaria	Tiempo (min)	
	5	10
Banano	0,40	1,48
Fresa	1,82	3,34
Lechuga	0,93	3,25

Según datos reportados por CODEX (2015) la carga microbiana inicial de *Staphylococcus aureus* que presenta la lechuga y las frutas en un tiempo inicial (0 min) es de 10^8 , sin embargo el límite máximo permisible para los productos de ensaladas verdes (lechuga) y frutas frescas es de $1,50E+03$ ufc/mL (Fuentes et al., 2005; INEN, 2008; Moragas & Bustos, 2017) al contrastar con los valores de la Tabla 9 se

evidencia que los valores obtenidos en el tiempo de 10 min corresponden al límite máximo

Como se observa en la Tabla 9, en el tiempo cero la carga microbiana es alta, debido a que no ha sufrido ningún proceso de saneamiento las matrices alimentarias, al encontrarse en el suelo y en contacto directo con el aire que son fuentes de contaminación directa, provocando que el producto no sea inocuo (**Feliziani et al., 2016; Keeratipibul et al., 2011**).

Un proceso de saneamiento se da cuando al menos se elimina el 50% de los microorganismos presentes en el producto (**Feliziani et al., 2016**), como se muestra los datos en las tabla 9 se ha logrado reducir especialmente los microorganismos presentes en la fresa, y en menor medida al banano.

La fresa es la fruta más importante debido a que se consume directamente, en tanto que el banano tiene una cubierta que le dan la rigidez necesaria para que no ingresen las bacterias dentro del fruto (**Blasco López & GómezMontaño, 2014; Vizcaino, 2015**).

Como se mencionó en la dilución 10^{-5} presenta una eficiencia cercana al 100%, al no presentar colonias evaluadas en fresa y lechuga, en tanto que en el banano se visualiza aun una colonia.

Tabla 9 Cuantificación en la aplicación del biosanitizante por el método de inmersión en las matrices alimentarias

Matriz Alimentaria	Ufc/mL		
	0 min	5 min	10 min
Banano	1,01E+05	4,00E+04	3,33E+03
Fresa	2,45E+06	3,67E+04	1,11E+03
Lechuga	1,95E+06	2,30E+05	1,11E+03

3.4.2 Aspersión.

La aplicación del sanitizante a través de este método no dio resultados favorables respecto con el de inmersión. **Delgado & Díaz (2006)**, menciona que al aplicar el

método de aspersión depende de la fuerza del aspersor siendo directamente proporcional con la fuerza mecánica que se ejerce sobre la superficie de las matrices, el spray que se utilizó no proporciono las fuerza necesaria para eliminar incrustaciones.

Tabla 10 Reducción logarítmica después de sanitizar las matrices

Matriz Alimentaria	Tiempo (min)	
	5	10
Banano	0,70	0,74
Fresa	0,79	0,84
Lechuga	0,85	1,68

Como se observa en la Tabla 11, Según la **INEN (2008) & Moraga & Bustos (2017)**, mencionan que el límite máximo permisible de mesófilos aerobios es de 1,50E+05 ufc/mL para hortaliza y frutas, las unidades formadoras de colonias obtenidas en el tiempo de 5 minutos se cumple para las tres matrices, en el tiempo de 10 min no hay ningún cambio significativo.

Significativamente la reducción logarítmica se evidencia a los 10 min después de haber aplicado el sanitizante respecto a la lechuga se evidencia un mayor grado de reducción en contraste con las demás matrices. Una eficaz actividad del biotensioactivo se da entre 10 min respecto a hortalizas mientras que para frutas frescas el tiempo estimado es de 10min aplicado en superficies de matrices alimentarias (**Coelho et al., 2007; Cruz et al., 2006**) lo cual coincide con lo reportado en la Tabla 11.

En el tiempo inicial la carga microbiana después del proceso de pos cosecha es elevado, evidenciado por el uso de agua de riego contaminada, mala manipulación de los productos, además de las condiciones de almacenamiento que no son adecuadas, ocasionando daños superficiales e incremento en la flora bacteriana (**Ramos et al., 2013; Sanzani et al., 2016**).

La lechuga es la matriz que presenta aún microorganismos a los 10 min de haber aplicado el Tensioactivo (Tabla 11), debido a que el método de aspersión no tuvo la fuerza necesaria para eliminar incrustaciones, además que es un cultivo con mayor

riesgos, ya que a nivel gourmet por lo general se lo consume crudo (**Feliziani et al., 2016; Sádaba et al., 2017**).

Tabla 11 Cuantificación en la aplicación del sanitizante por el método de aspersión en las matrices alimentarias

Matriz Alimentaria	Ufc/mL		
	0 min	5 min	10 min
Banano	3,09E+05	6,22E+04	5,67E+04
Fresa	3,36E+06	5,44E+05	4,80E+05
Lechuga	1,80E+06	2,56E+05	3,78E+04

3.5 Cinética de crecimiento bacteriano de las cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

La curva de crecimiento bacteriano se la realizo mediante la concentración celular por mL y con la medición de la densidad óptica (D.O), A medida que la concentración celular aumenta, el cultivo se hace más turbio y se reduce la cantidad de luz transmitida que alcanza la célula fotoeléctrica (**Ramírez et al., 2005**). Esta reducción de la intensidad de luz transmitida es consecuencia de la difracción de la luz por parte de las células, mientras que el conteo en placa permite el recuento de células viables capaces de reproducirse y generar colonias sobre un medio sólido (**Díaz, 2016**).

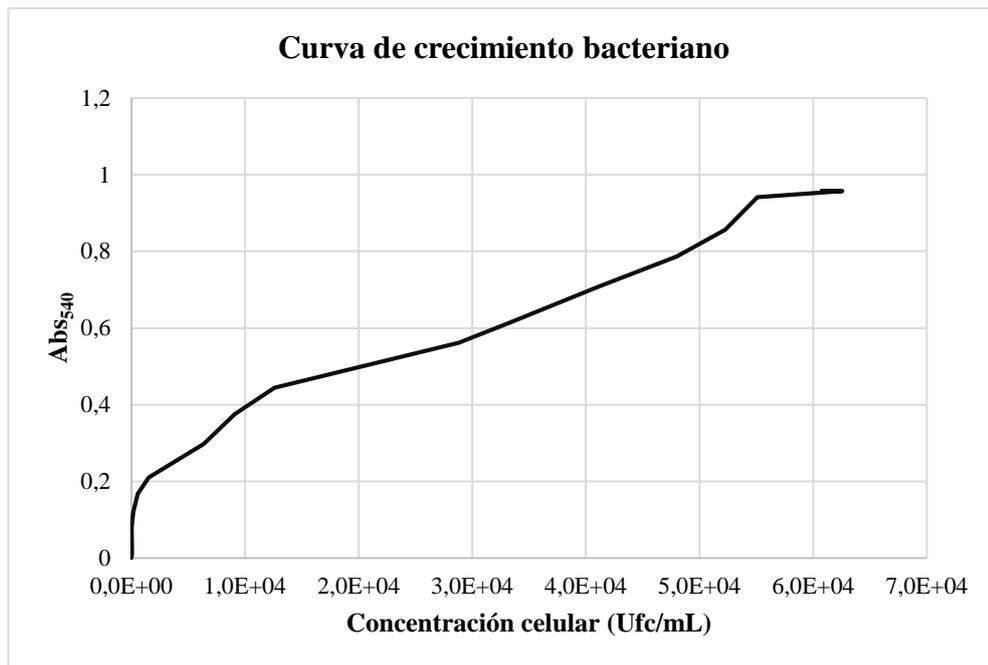


FIGURA 3 Cinética de crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*

La D.O es el método más rápido pero es menos sensible que el método del conteo en placa. **Castañeda & Sánchez (2016)** menciona que la fase estacionaria inicia cuando los nutrientes se están agotando, en tanto lo que se genera es acumulación de desechos como se observa en la Figura 3 esta fase empieza en una absorbancia alrededor de 0.9.

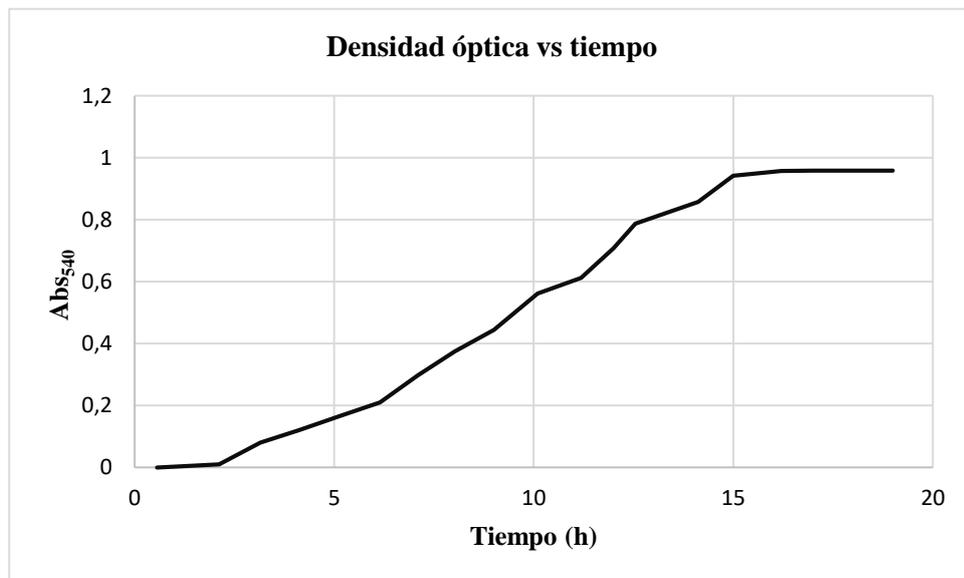


FIGURA 4 Variación de la densidad óptica a través del tiempo de *E. coli*

La fase de latencia de *E. coli*, sembrada en medio LB, termina alrededor de las dos horas, en tanto que la fase exponencial según **Castañeda & Sánchez (2016)** debe tener un tiempo máximo de 18 horas, en la Figura 4 se evidencia la fase exponencial se termina aproximadamente a la hora 15 reduciéndole en 3 horas con la aplicación del sanitizante, después de ello el crecimiento se vuelve constante, consumiendo los nutrientes del medio, el primer compuesto que se termina es el carbono o nitrógeno (**Kacena et al., 2016; Kehr et al., 2004**).

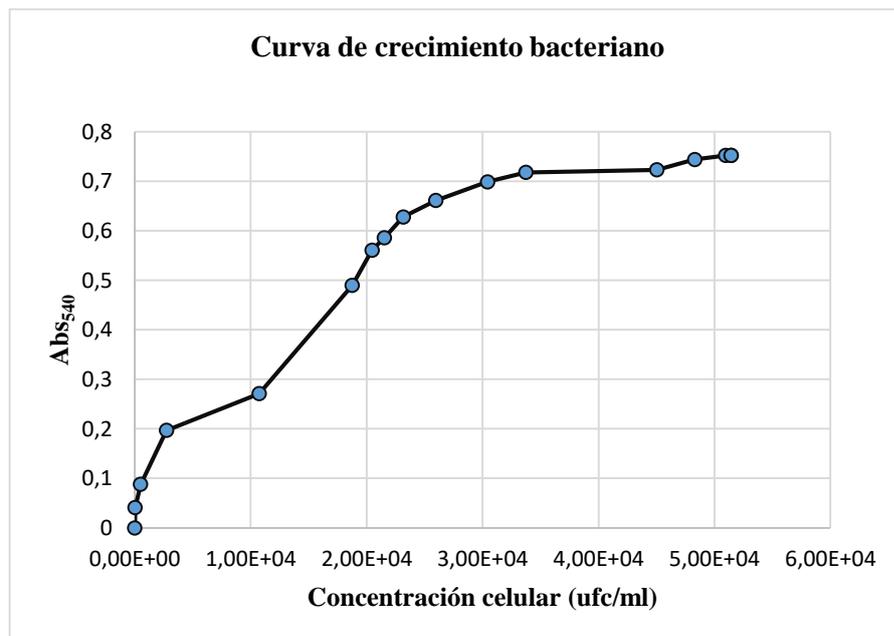


FIGURA 5 Cinética de crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus*.

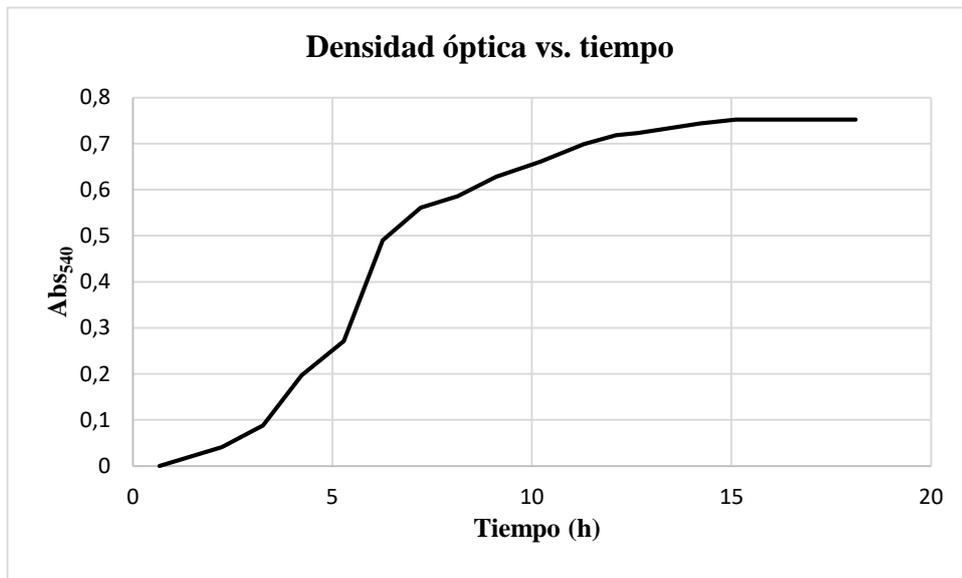


FIGURA 6 Variación de la densidad óptica a través del tiempo de *Staphylococcus aureus*

Para la bacteria de *Staphylococcus aureus* la fase estacionaria empieza a una absorbancia de 0,6 cuándo se aplica un sanitizante como se observa en la figura 5 con resultados obtenidos después de aplicar el biotensioactivo (Franco et al., 2013). Se asemeja con los resultados obtenidos experimentalmente, la fase exponencial de la cinética bacteriana se evidencia un ligero pico el cual se debe a las condiciones en las que estaba el medio de cultivo en los que interfiere temperatura, condiciones del medio y velocidad de agitación en la que se mantiene hasta que se realice la lectura de la densidad óptica.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se determinó la eficiencia y efectividad del biosanitizante sobre cuatro cepas bacterianas, el análisis estadístico mostro que los mejores resultados en la placa fue sobre *Escherichia coli* ATCC 11775 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.
- La formulación que obtuvo mejores resultados aplicados en placas en medio LB para *S aureus*, *E coli*, *B cereus* y Agar Nutritivo para *L monocytogenes* fue la formulación desarrollada en una concentración del 60%, teniendo el mayor halo de inhibición frente a las cuatro cepas bacterianas con las que se realizaron los ensayos.
- Se determinó que el tiempo de crecimiento de *E. coli* es de 15 horas y llega a una O.D de 0.7, en tanto que para *S. aureus* es de 14 horas con un O.D. de 0.6, datos que son necesarios para los cálculos de la IC50 y la CMI (Concentración mínima inhibitoria).
- El mejor método de aplicación del biosanitizante fue el de inmersión en un tiempo de 10 min respecto a las tres matrices alimentarias: banano, fresa y lechuga, asegurando la inocuidad del producto y cumpliendo con los límites permisibles de carga microbiana para frutas y hortaliza.

4.2 Recomendaciones

- Evaluar la eficiencia del sanitizante en base a un tensioactivo de origen microbiano en diferentes matrices alimentarias como en tubérculos.
- Determinar nuevos métodos de extracción de biotensioactivo utilizando fuentes orgánicas con el objetivo de reducir costos y obtener un mayor rendimiento del tensioactivo.

- Utilizar discos de dispersión en la inhibición bacteriana que se aplique a matrices alimentarias o en placa.
- Evaluar el uso de aplicaciones como SMART DISNTANCE para la detección de los diámetros de los halos inhibitorios obtenidos.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, A., & Lavín, M. (2019). Diseño de un biorreactor para la producción de inóculo de *Salmonella enteritidis*. *Revista Cubana de Química*, 31(1), 20. <http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v31n1/2224-5421-ind-31-01-120.pdf>
- Adonis, R., Araya, A., Espinoza, J., Ilturrieta, M., Neira, K., & Nuñez, P. (2016). *Comité de Inocuidad de ASOEX Santiago, marzo 2016*.
- Adriano, J. (2017). *Efecto de los ácidos acético Y acetilsalicílico en el control fúngico en poscosecha de fresa (Fragaria vesca)* [Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/8883/1/T-UCE-0004-06.pdf>
- AEBE. (2016). BANANO. *Conferencia de Las Naciones Unidas Sobre El Comercio y Desarrollo UNCTAD*, 1–19. http://unctad.org/es/PublicationsLibrary/INFOCOMM_cp01_Banana_es.pdf
- Alarcón, M., Oyarzo, C., Escudero, C., Cerda, F., & Valenzuela, F. (2017). Portación de. *Rev. Med Chile*, 2(145), 1559–1564. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v145n12/0034-9887-rmc-145-12-1559.pdf>
- Altmajer, D., Bravo, V., & Olea, J. (2011). Detergentes Biodegradables : Ensayos de Lavado. *Fabricacion Detergentes*, 309.
- Aranberri, I., Binks, B., Clint, J., & Fletcher, P. (2006). Elaboracion Y Caracterización De Emulsiones. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 7(3), 211–231.
- Ariza, Y., & Sánchez, L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium sp.* *Nova*, 10(18), 149. <https://doi.org/10.22490/24629448.1003>
- Bejarano, J., & Suárez, L. (2015). Algunos peligros químicos y nutricionales del consumo de los alimentos de venta en espacios públicos. *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, 47(3), 349–360. <https://doi.org/10.18273/revsal.v47n3-2015011>
- Bello, E. (2014). *Contaminantes Químicos De Los Alimentos. Residuos De Plaguicidas. Contaminantes Físicos*. Instituto Aragonés de Ciencias de La Salud. <http://www.ics-aragon.com/cursos/salud-publica/2014/pdf/M5T14.pdf>
- Blasco López, G., & GómezMontaño, F. J. (2014). Propiedades funcionales del

plátano (*Musa sp.*). *Revista Médica de La Universidad Veracruzana*, 14(2), 22–26. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852016000300006

Borja, J. (2016). La producción de banano bajo el sistema de comercio justo: un análisis del caso ecuatoriano. *Productividad Agrícola*, 3(1), 7–10. <https://doi.org/10.29166/siembra.v3i1.185>

Brand, D. (Gerencia ambiental). (2008). Efectos de los biocombustibles en el medio ambiente. *Biocombustibles: Perspectivas, Riesgos y Oportunidades*, 2, 63–83.

Cámara, M., Morales, P., Fernández, V., & Sánchez, R. (2016). Promoción del consumo de frutas y hortalizas: conocimiento científico y actividad física. *Nutrición y Bromatología*, 2(3), 123-156. file:///C:/Users/GUSTAVO VACA/Documents/Lupita/DECIMO/Proyecto de Investigación/Tesis/L Promoción del consumo de frutas y hortalizas en España, conocimiento científico y actividad física.pdf

Cardozo, N. (2016). *Evaluación de la efectividad de la proteína OmpA de Escherichia coli K12 W3110/pCA24N como biosurfactante para la reducción de viscosidad*. Univeridad de Los Andes.

Carrillo, G. (2016). Determinación microbiología y de metales pesados en lechiga de repollo (*Lactuca sativa*), expendidos en los diferentes mercados del distrito metropolitano de Quito. *Tesis*, 1, 110. <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>

Castañeda, E., & Sánchez, L. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus sp.*, primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium sp.* *Nova*, 14(26), 53. <https://doi.org/10.22490/24629448.1751>

Castro del Campo, N., Chaidez, C., Rubio, W., & Valdéz, J. (2014). Sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutos mínimamente procesados. *Salud Pública*, 30(1), 134–141. <https://doi.org/1561-3127>

Chiqui, F., Lema, M., & Avilés, H. (2010). *Evaluación del rendimiento en el cultivo de fresa (*Fragaria sp*) variedad oso grande, bajo invernadero mediante dos tipos de fertilización (orgánica y química) en la parroquia Octavio Cordero Palacio, Cantón Cuenca* [Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca].

<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/4745>

- Cobo, C. (2017). *Evaluación de medios de cultivo líquidos para la multiplicación de la bacteria Bacillus subtilis* [Universidad de San Francisco de Quito]. <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6598/1/131031.pdf>
- Coelho, C., Bellato, C., Santos, J., Ortega, E., & Tsai, S. (2007). Effect of phytate and storage conditions on the development of the ‘ hard-to-cook .’ *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1243(February), 1237–1243. <https://doi.org/10.1002/jsfa>
- Coronel, N., & Yáñez, V. (2018). Análisis de los patrones de producción de lipopéptidos antifúngicos de Bacillus subtilis durante diferentes etapas de crecimiento [Universidad de las Américas]. In *Journal of Linguistics* (Vol. 3, Issue 2). <https://doi.org/10.18041/2382-3240/saber.2010v5n1.2536>
- Cortés, A., Díaz, M., & Salgado, M. (2017). Bacillus cereus: Las enfermedades. *Agroproductividad*, 10(10), 3–9. <https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/1122/1/PUB-ARTICULO-3995.PDF>
- Cortez, K. (2016). *Bioquímica Estructural y Metabólica* [Universidad Central del Ecuador]. <https://ocw.unican.es/pluginfile.php/800/course/section/857/Tema%25207.%2520Lipidos.pdf>
- Cruz, S., Acedo, E., Díaz, M., Islas, M., & González, G. (2006). Efectividad de sanitizantes en la reducción microbiana y calidad de frutas frescas. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 29(4), 299–306.
- Cuervo, J. (2010). *Aislamiento y Caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales*. (Vol. 4) [Pontificia Universidad Javeriana]. <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis404.pdf>
- Decurninge, A. (2014). *Multivariate quantiles and multivariate L-moments*. <http://arxiv.org/abs/1409.6013>
- Díaz, C. (2016). Caracterización Microbiológica [Universidad Complutense]. In

Microbiologia. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2685/5_-_Caracterización_microbiológica.pdf?sequence=10
http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2685/5_-_Caracterización_microbiológica.pdf?sequence=10

- Diomedi, A., Chacón, E., Delpiano, L., Hervé, B., Jemenao, M. I., Medel, M., Quintanilla, M., Riedel, G., Tinoco, J., & Cifuentes, M. (2017). Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. *Revista Chilena de Infectología*, 34(2), 156–174. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182017000200010>
- Donay, J., Fernandes, P., Lagrange, P., & Herrmann, J. (2007). Evaluation of the inoculation procedure using a 0.25 McFarland standard for the BD phoenix automated microbiology system [1]. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(12), 4088–4089. <https://doi.org/10.1128/JCM.01847-07>
- Duan, M., Li, H., Gu, J., Tuo, X., Sun, W., Qian, X., & Wang, X. (2017). Effects of biochar on reducing the abundance of oxytetracycline, antibiotic resistance genes, and human pathogenic bacteria in soil and lettuce. *Environmental Pollution*, 224(5), 787–795. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.021>
- Durán, M., & Abajas, R. (2008). Enfermedades de origen alimentario. Intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias. *Nutrición y Dietética*, 2(1), 1–12. <https://ocw.unican.es/pluginfile.php/931/course/section/1044/tema4.pdf>
- EACOSAN. (2015). *Presencia de compuestos de amonio cuaternario en los alimentos*. 1–2. http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/contenido_extra_9_amonios_cuaternarios.pdf
- Elika, E. (2013). *Tipos de contaminación alimentaria*. Fundacion Vasca Para La Seguridad Agroalimentaria. <https://alimentos.elika.eus/wp-content/uploads/sites/2/2017/10/6.Tipos-de-contaminación-alimentaria.pdf>
- Fan, H., Ru, J., Zhang, Y., Wang, Q., & Li, Y. (2017). Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiological Research*, 199, 89–97.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.03.004>

- FAO. (2009). Análisis de riesgos relativos a la inocuidad de los alimentos Guía para las autoridades nacionales de la inocuidad de los alimentos. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (2nd ed., Vol. 53, Issue 9). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- FAO. (2015a). Caracterización de peligros de patógenos en los Alimentos y el Agua. *Serie de Evaluación de Riesgos Microbiológicos*, 3(2), 14–67. <http://www.fao.org/3/a-y4666s.pdf>
- FAO. (2015b). *Inocuidad de los alimentos*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>
- Farfán, M. L. M. (2008). *Evaluación del efecto de la relación carbono nitrógeno y el nivel de oxígeno disuelto sobre la producción de biosurfactantes a partir de Bacillus subtilis* [Instituto Politécnico Nacional]. [http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/18382/MaLourdesMejia-CIBA-IPN MAESTRIA TEC AVANZADA-2008.pdf?sequence=1](http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/18382/MaLourdesMejia-CIBA-IPN%20MAESTRIA%20TEC%20AVANZADA-2008.pdf?sequence=1)
- Félix, L. (2019). *Propuesta de un programa de capacitación para la manipulación conservación de alimentos en el mercado municipal del cantón Pimampiro Provincia de Imbabura*.
- Feliziani, E., Lichter, A., Smilanick, J. L., & Ippolito, A. (2016). Disinfecting agents for controlling fruit and vegetable diseases after harvest. *Postharvest Biology and Technology*, 122(2015), 53–69. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.016>
- Fino, V., & Kniel, K. (2008). UV light inactivation of hepatitis A virus, aichi virus, and feline calicivirus on strawberries, green onions, and lettuce. *Journal of Food Protection*, 71(5), 908–913. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.5.908>
- Flores, J., Bustamante, F., Cerda, F., Valenzuela, N., & Aguirre, J. (2018). Cumplimiento de los criterios microbiológicos del reglamento sanitario de los alimentos (RSA) para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (LPC) en el sur de Chile. *Inocuidad de Alimentos*, 1(4), 2–5. <http://e-gnosis.udg.mx/index.php/trabajosinocuidad/article/view/243/166>

- Franco, L., Matiz, G., Pájaro, I., & Gómez, H. (2013). Actividad antibacteriana in vitro de extractos y fracciones de *Physalis peruviana* L. Y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(3), 230–237. file:///C:/Users/GUSTAVO VACA/Downloads/1147-2530-1-SM (1).pdf
- Fuentes, F., Campas, O., & Meza, M. (2005). Calidad sanitaria de alimentos disponibles al público de Ciudad Obregón, Sonora, México. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 6(3). file:///C:/Users/GUSTAVO VACA/Downloads/149-261-1-SM.pdf
- García, A., & Romero, N. (2012). *Estudio de factibilidad de la producción y exportación a centroamerica y el caribe de lechuga gourmet a partir des desarrollo de tecnica nutrient film (NFT)* (Vol. 66) [Universidad de Bogota]. <https://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/bitstream/handle/20.500.12010/1706/T201.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gibert, M. (2010). *Deteccion y caracterización de aislados de Escherichia coli origen clínico* [Universidad Complutense de Madrid]. [https://www.visavet.es/data/tesis/deteccion-y-caracterizacion-de-aislados-de Escherichia-coli-de-origen-clinico-y-fecal-en gallinas-ponedoras.pdf](https://www.visavet.es/data/tesis/deteccion-y-caracterizacion-de-aislados-de-Escherichia-coli-de-origen-clinico-y-fecal-en-gallinas-ponedoras.pdf)
- González, L., Franco, M., Sánchez, C., & Campos, M. (2003). *Norma Sanitaria Que Establece Los Criterios Microbiologicos De Calidad Sanitaria E Inocuidad Para Los Alimentos Y Bebidas De Consumo Humano Capítulo I Generalidades*. Ministerio de Salud de La República Del Perú. http://www.digesa.minsa.gob.pe/norma_consulta/Proy_RM615-2003.pdf
- González, Lomeli, Leopoldo, L., & Solano, G. (2011). Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 17(1), 5–11. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcsh/v17nspe1/v17nspe1a2.pdf>
- Guentzel, J., Liang, K., Callan, M., Emmons, S., & Dunham, V. (2008). Reduction of bacteria on spinach, lettuce, and surfaces in food service areas using neutral electrolyzed oxidizing water. *Food Microbiology*, 25(1), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.08.003>

- Gutiérrez, L., & Agudelo, D. (2009). Control del crecimiento In Vitro sobre cepas Gram positivas y Gram negativas productoras de mastitis. *Revista Lasallista de Investigación*, 6(1), 67–74. <https://www.redalyc.org/pdf/695/69514350010.pdf>
- Hee, K., Byung, Y., Hyun, S., Hee, O., Tohoru, K., & Tani, Y. (2011). Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 41–46. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82784-5](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82784-5)
- Herrera, F., & Santos, J. (2015). Presencia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes en queso sobre crema artesanal. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 18(1), 29–37.
- INEN. (2008). *Instituto Ecuatoriano De Normalización-Jugos, Pulpas, Concentrados, Nectares, Bebidas De Frutas Y Vegetales. Requisitos*. Instituto Ecuatoriano de Normalización.
http://apps.normalizacion.gob.ec/fileserver/2018/nte_inen_2337.pdf
- INEN. (2013a). *Control microbiológico de los alimentos mohos y levaduras viables, recuento en placa por siembra en profundidad*. Norma Técnica Ecuatoriana. https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_1529-10-1.pdf
- INEN. (2013b). *Norma General del Códex para frutas y vegetales*. Pagina Web. <http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/ACTUALIZACION/04112014/192-CODEX-UNIDO.pdf>
- INIA. (2017a). Manual de manejo agronómico de la frutilla. In C. Morales (Ed.), *Instituto de Investigación Agropecuaria* (Vol. 17, p. 102). [https://doi.org/717 - 4829](https://doi.org/717-4829)
- INIA. (2017b). Manual de producción de lechuga. In G. Saavedra (Ed.), *Instituto de Investigación Agropecuaria* (Vol. 73, Issue 7, pp. 394–399). <https://doi.org/10.1055/s-2007-997160>
- Isch, T. (2016). *Estudio de un sistema para el tratamiento de efluentes contaminados con compuestos surfactantes por un método Fenton y Fnton Modificado con un Agente Quelante (EDTA)*.

- Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., & Alexandridis, P. (2020). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 275, 102061. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>
- James, R., & Zimmerman, Z. (2014). Biorreactores y su aplicación. In K. Kurt (Ed.), *Ingeniería Ambiental* (Segunda, p. 512). <https://sites.google.com/site/bioingenieriauv15/unidad-2-biorreactores-y-su-aplicacion>
- Jaramillo, J., Aguilar, A., Espitia, E., Tamayo, P., Argüello, O., & Guzmán, M. (2014). *Modelo tecnológico para el cultivo de lechuga en el Oriente Antioqueño* (E. Corpoica (ed.); 2nd ed.). Garcia, Liliana. https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/13758/75472_65800.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Javaheri, M., Jenneman, G. E., McInerney, M. J., & Knapp, R. M. (2005). Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(3), 698–700. <https://doi.org/10.1128/aem.50.3.698-700.1985>
- Jiménez Islas, D., Medina Moreno, S. A., & Gracida Rodriáquez, J. N. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensioactivos. In *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* (Vol. 26, Issue 1, pp. 65–84).
- Kacena, M. A., Merrell, G. A., Manfredi, B., Smith, E. E., Klaus, D. M., & Todd, P. (2016). Bacterial growth in space flight: Logistic growth curve parameters for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(2), 229–234. <https://doi.org/10.1007/s002530051386>
- Kai, A., Konishi, N., & Obata, H. (2010). [Diarrheagenic *Escherichia coli*]. *Clinical Microbiology*, 68(1), 203–207. <https://doi.org/10.1016/b978-012677530-3/50289-0>
- Keeratipibul, S., Phewpan, A., & Lursinsap, C. (2011). Prediction of coliforms and *Escherichia coli* on tomato fruits and lettuce leaves after sanitizing by using Artificial Neural Networks. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.015>

- Kehr, J., Morales, B., Contreras, P., Castillo, L., & Aranda, W. (2004). Calidad microbiológica de una fórmula enteral lista para usar. *Revista Chilena de Infectología*, 21(4), 312–316. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182004000400005>
- Keller, T. (2019). *Classification and Application of DLCs*. 12, 1–5.
- León, L., & Mejía, L. (2012). *Determinación del tiempo de crecimiento para cosecha y comportamiento fisiológico poscosecha del banano variedad “gross michael”* [Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/2644/libardoleonagaton.2002.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- López, F., Sosa, A., Altagracia, M., Ochoa, J., & Córdova, R. (2017). Toxicológico de productos de limpieza de uso comercial. In *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas* (Vol. 47, Issue 1). <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v46n1/1870-0195-rmcf-46-01-00033.pdf>
- López, S. M. Y. (2015). *Bacillus un género que alberga especies que cumplen diversos roles biológicos*. https://inta.gob.ar/sites/default/files/lic._lopez_bacillus.pdf
- Margall, N., Domínguez, Á., Prats, G., & Salleras, L. (1997). Escherichia coli enterohemorrágica. In *Revista Espanola de Salud Publica* (Vol. 71, Issue 5, pp. 437–443). Kurt, M. <https://doi.org/10.1590/S1135-57271997000500002>
- Mariano, J. L. (2015). *Dímeros de glucósidos : Una nueva familia de tensoactivos no iónicos biodegradables*. 210.
- Martín, N. M., & Morales, C. M. (2016). *Estudio del efecto de las propiedades de agentes surfactantes en la eficiencia de la separación de emulsiones de agua en crudo pesado*. 1–25.
- Martínez, J. (2018). *Elaboración de biopreparados a base de Bacillus sp. para controlar Alternaria spp. en el cultivo de Brassica oleracea var* [Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito]. In *Tesis*. <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Mateus, T., Rocha, H., Maia, R., Teixeira, P., Rocha, H., & Maia, R. (2017). Listeria e Listeria monocytogenes em alimentos. *Tecnoalimentar*, 5(5), 1123–1144.

file:///C:/Users/GUSTAVO VACA/Desktop/Mendeley/listeria 2.pdf

- Matos, R., Torres, G., Rosabal, E., Fernández, O., Matos, A. R., Torres, E. G., & Escalona, A. (2005). Peligros biológicos e inocuidad de alimentos. *Redvet*, VI(09). <https://www.redalyc.org/pdf/636/63612657008.pdf>
- Medina, E. (2010). Dióxido de Cloro y Clorito RESUMEN DE SALUD PÚBLICA Dióxido de Cloro y Clorito. *Agencia Para Sustancias Toxicas y Registro de Enfermedades*, 3.
- Méndez-Úbeda, J. M., Flores Hernández, M. S., & Páramo-Aguilera, L. . (2018). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente a hongos fitopatógenos. *Nexo Revista Científica*, 30(2), 96–110. <https://doi.org/10.5377/nexo.v30i2.5530>
- Montes de Oca, J. (2017). *Prefacio* [Universidad Nacional del Sur]. http://repositoriodigital.uns.edu.ar/bitstream/123456789/4359/5/tesis_MdeO.pdf
- Moragas, M., & Bustos, P. (2017). *Recopilación normas microbiológicas de los alimentos y asimilados (superficies, aguas diferentes de consumo, aire, subproductos) otros parámetros fisicoquímicos de interés sanitario*. Food Sanitizer. https://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/doc_seguridad_alimentaria/es_def/adjuntos/control-alimentos/inspecciones/normas-microbiologicas-alimentos-2017.pdf
- MSP. (2019). *Ministerio de Salud Y proteccìon*. 2, 1–201. <https://is.gd/p2ngwX>
- Muñoz, C. (2011). *Combate biológico del moho gris (Botrytis cinerea) bajo dos condiciones de almacenamiento, del fruto fresa (Fragaria x ananassa)*. [niversidad Técnica de Ambato]. http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/878/1/Tesis_t003agr.pdf
- N.R. (2010). Tensoactivos. *Tensoactivos*, 1–8.
- Nagua, E. (2016). Uso De La Bacteria *Bacillus Subtilis* Como Agente De Control Biológico De Hongos Fitopatógenos En Cultivos Tropicales [Universidad de Machala]. In *Microbiologia* (2nd ed.). <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.04.010>

- Norman, C., & Trombetta, J. (2007). El uso de surfactantes en proyectos de recuperación terciaria. *Nota Técnica. Tiorco*. [http://oilproduction.net/files/Nota Tecnica Agosto 2007 \(2\).pdf](http://oilproduction.net/files/Nota_Tecnica_Agosto_2007_(2).pdf)
- Novak, J., Sapers, G., & Juneja, V. (2015). Washing and sanitizing raw materials for minimally processed fruit and vegetable. In *Microbial safety of minimally processed foods* (4th ed., pp. 1–24). [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Y4_MBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA221&dq=+sanitizer+aplicated+in+dipping+and+spray+in+fruits+&ots=V_r9_d_yIf&sig=KSb8CpXAV_h-QgvLXNY4kv3sPg4#v=onepage&q=sanitizer aplicated in dipping and spray in fruits&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Y4_MBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA221&dq=+sanitizer+aplicated+in+dipping+and+spray+in+fruits+&ots=V_r9_d_yIf&sig=KSb8CpXAV_h-QgvLXNY4kv3sPg4#v=onepage&q=sanitizer+aplicated+in+dipping+and+spray+in+fruits&f=false)
- Olmedo Sanchez, M. T. (2008). Subproductos de la desinfección del agua por el empleo de compuestos de cloro . Efectos sobre la salud. *Hig. Sanid. Ambient.*, 342, 335–342.
- Orellana, P. (Miniqua). (2014). *Desarrollo y optimización de una formulación de detergente más biodegradable* (Vol. 2, pp. 1–18).
- Oteo, J., & Alós, I. (2009). Listeria y Listeriosis. *Profesión Veterinaria*, 2(71), 58–67. <http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloId=705418>
- PARA, U., & ACERO, G. DE. (2011). Universidad De San Carlos De Guatemala Facultad De Ingeniería. *Emecanica.Ingenieria.Usac.Edu.Gt*, 1–75. <http://emecanica.ingenieria.usac.edu.gt/sitio/wp-content/subidas/6ARTÍCULO-III-INDESA-SIE.pdf>
- Parente, A., Farias, C., Maciel, V., & Luciana, R. (2015). Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catalysis Today*, 255, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2015.01.046>
- Parra, E. (2018). *Producción y comercialización de frutilla (Fragancia sp) en la Parroquia de Yaruquí, cantón Quito, Provincia de Pichincha* [Universidad Técnica del Norte]. <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/8658/1/03-AGN-041-TRABAJO-DE-GRADO.pdf>
- Pereira, J. (2012). Estado del arte sobre efecto de los alcoholes en las propiedades interfaciales de los surfactantes. *Revista INGENIERÍA UC*, 19(2), 76–85.

- Pereira, L., Oliveira, M., Martins, H., Vale, L., Silas, R., Alvarenga, D., & Hilsdorf, R. (2019). Sanitizing cinnamaldehyde solutions against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms formed on stainless steel surfaces. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22, 1–8. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.14418>
- Pérez, I. (2012). *Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias. *Revista Cubana de Salud Pública*, 38(1), 98–108. <https://doi.org/10.1590/s0864-34662012000100010>
- Porrás-Loaiza AP, L.-M. A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. In *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* (Vol. 3, Issue 1, pp. 121–134). [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Porrás-Loaiza-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Porrás-Loaiza-et-al-2009.pdf)
- Rafael, A., Hern, L., Violeta, N., Rivas, G., & Patricia, N. (2017). “ *Estudio de la humectabilidad y dispersión de crudos pesados sobre núcleos de yacimiento aplicando surfactantes con base sulfato .*”
- Ramírez, J., Contreras, G., & Gómez, C. (2005). La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(3–4), 92–101. https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-3_4f.pdf
- Ramirez, S. (Centro de I. Q. (2017). Síntesis, purificación y evaluación de surfactantes a partir de derivados de biomasa. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 8(9), 1–58. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ramos, B., Miller, F., Brandão, T., Teixeira, P., & Silva, C. (2013). Fresh fruits and vegetables - An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20(4), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.002>
- Raymundo, A., Empis, J., Sousa, I., Gallegos, C., & Franco, J. M. (2001). Influencia de la relación proteína de altramuz/tensioactivo en las propiedades de flujo y texturales de emulsiones aceite en agua. *Grasas y Aceites*, 52(3–4), 235–240. <https://doi.org/10.3989/gya.2001.v52.i3-4.363>
- Reagenti, C. E., & Reagents, C. E. (2013). *Ficha de datos de seguridad Ficha de datos de seguridad. Categoría 3*, 2–9.

- Ríos, F. (2012). *Comportamiento ambiental de Tensioactivos comerciales: Biodegradabilidad, Toxicidad y ozonización*.
<http://depa.fquim.unam.mx/fina/presenta/tensioactivos.pdf>
- Rivera, Á., Rivas, F., Panimboza, J., & Leiva, M. (2017). Efecto del iodocitrato de cobre (Citrubact) sobre Botrytis cinerea Pers en Fragaria vesca L . cv . Albion en la provincia Tungurahun. *Centro Agrícola*, 44(4), 82–87.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160470>
- Robalino, D. (2020). Determinación de la velocidad máxima de transferencia de oxígeno y la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno en cultivos por lote de la bacteria Bacillus subtilis DS23 en un biorreacto [Universidad Técnica de Ambato]. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue February 2020). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Rodríguez, A., & Mejía, A. (2002). Consideraciones Sobre Surfactantes. *Tensioactivos*, 2(7), 187–200.
<http://repositoriodigital.uns.edu.ar/bitstream/123456789/1992/5/CAPITULO1.pdf>
- Rodríguez, H. R. (2009). Calidad Integral de Alimentos y Ecología Microbiana. *Nutrición Humana*, 5(2), 76–93.
http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/29129/Documento_completo.pdf?sequence=1
- Rodríguez, M. (2009). Comportamiento Reológico De Disoluciones Acuosas De Surfactantes Comerciales No Iónicos. In *Doctor*.
- Rodríguez, Y. (2018). *Infecciones alimentarias transmitidas por frutas y verduras frescas* [Universidad La Laguna]. [file:///C:/Users/GUSTAVO VACA/Desktop/Mendeley/discusion s aureus.pdf](file:///C:/Users/GUSTAVO VACA/Desktop/Mendeley/discusion%20s%20aureus.pdf)
- Romero, J., & Catañeda, B. (2018). *Modelo de interacción molecular de metabolitos presentes en la especie Cannabis con la enzima ciclooxigenasa 1 y la enzima ciclooxigenasa 2* (Vol. 1) [Universidad de Cincias Aplicadas y Ambientales]. <https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/1376/1/TESIS - PROYECTO DE GRADO 1111.pdf>
- Rooney, A. P., Price, N. P. J., Ehrhardt, C., Sewzey, J. L., & Bannan, J. D. (2009).

Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), 2429–2436. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.009126-0>

Sádaba, S., Del Castillo, A., & Sanz de Galdeano, P. (2017). *Acercamiento de nuevas formas de producción. Lechuga En Cultivo Hidropónico*. <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/49000/201/6/T-UTB-FACIAG-AGR-000061.pdf>

Salager, J.-L. (2015). *Surfactantes : tipos y usos* (Vol. 2) [Universidad de Los Andes]. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:SURFACTANTES+Tipos+y+Usos#0%5Cnhttp://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S300A.pdf>

Salcido, N., & Corona, J. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta Universitaria*, 20(1), 43–52. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41613084005>

Sancada, L. (2015). *Estudio del contenido de oligosacáridos, glicolípidos y fosfolípidos de la leche de oveja. participación en la defensa del recién nacido frente a infecciones* [Universidad de Salamanca]. [https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/17857/DBBM_Estudio del contenido de oligosacaridos.pdf;jsessionid=58C5AEDEE1CC8EB99C8530169B79B497?sequence=1](https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/17857/DBBM_Estudio%20del%20contenido%20de%20oligosacaridos.pdf;jsessionid=58C5AEDEE1CC8EB99C8530169B79B497?sequence=1)

Sánchez, F. (2016). Importance of *Bacillus subtilis* lipopeptides in the biological control of diseases in crops of high economic value. *Bionatural*, 1(3), 135–138. <https://doi.org/10.21931/rb/2016.01.03.7>

Sanchez, F., Mendoza, N., & Mejía, I. (2002). Ensayo de diferentes tipos de biorreactores para escalar la producción de la enzima ligninoperoxidasa en cultivos sumergidos. *Facultad Química Farmacéutica*, 9(0121–4004), 17–26. <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169818107002.pdf>

Sánchez, L. (2006). Influencia del contraión en las propiedades biológicas de tensioactivos aniónicos. *Proyecto Fin de Carrera, Escuela Politécnica Superior*

de Ingeniería Industrial de Barcelona.

- Sanz, A. (2017 C.E.). La Industria de los agentes tensoactivos. In L. Serrano (Ed.), *Química Orgánica Industrial* (2nd ed., p. 123).
- Sanzani, S., Reverberi, M., & Geisen, R. (2016). Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. *Postharvest Biology and Technology*, *122*, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.07.003>
- Serra, C. (2017). *Stability and Safety of Fresh-cut Fruits*. Food Safety. https://ddd.uab.cat/pub/tfg/2017/180943/TFG_cserrameya_poster.pdf
- Soto, Z., Pérez, L., & Estrada, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: Una mirada en Colombia. *Salud Uninorte*, *32*(1), 105–122. <http://scielo.isciii.es/pdf/resp/v71n5/colaboracion.pdf>
- Taipe, P. (2017). Estudio de métodos para mejorar el proceso post cosecha de banano orgánico de exportación en la asociación del Sector La Manuela Ignacio Escudero Suliana [Universidad César Vallejo]. In *Ucv*. http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/16800/Carranza_VJC.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Torres, J., & Durán, S. (2015). Fosfolípidos: Propiedades y efectos sobre la salud. In *Nutricion Hospitalaria* (Vol. 31, Issue 1, pp. 76–83). <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.7961>
- Torres, S. (2012). Guía práctica para el manejo de banano orgánico en el valle del Chira. In J. Nizama, V. Palacios, & Ú. Olguín (Eds.), *Manual del Banano*. https://www.swisscontact.org/fileadmin/user_upload/COUNTRIES/Peru/Documents/Publications/manual_banano.pdf
- Valero, A., Carrasco, E., & Zurera, G. (2019). Alerta sanitaria por listeriosis en España . Enfoques preventivos basados en un esquema de Evaluación de Riesgos. *SEMFORD*, *3*(3), 7–10. http://dspace.umh.es/bitstream/11000/5708/1/3-Art_AlertaSanitaria.pdf
- Vera, W., & Méndez, T. (2018). Producción y exportación de lechugas hidrópicas al mercado Aleman. *Campo Investigativo de Las Ciencias Agropecuarias*, *3*(2),

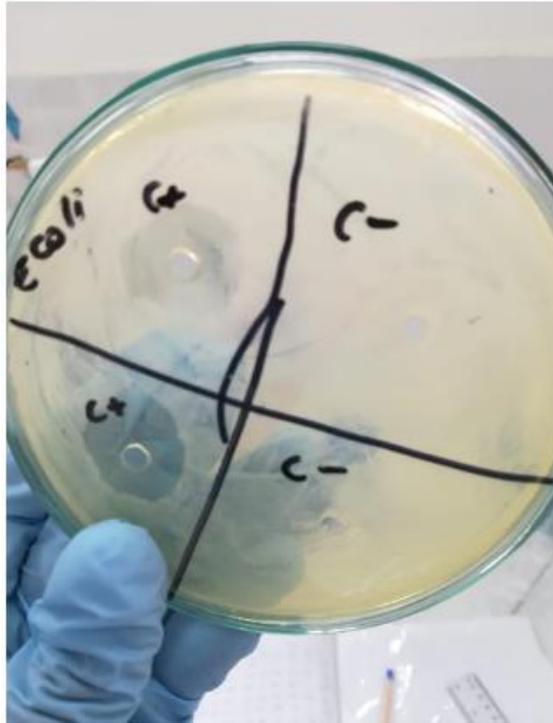
118–132.

<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/1428/1/2811.pdf>

- Vignoli, R. (2006). Esterilización, desinfección y antisepsia. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 609–629. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/esterilizacionydesinfeccion.pdf>
- Villareal, J. (2019). *Análisis de la influencia del Balance Hidrofílico-Lipofílico en los surfactantes usados para recuperación mejorada de petróleo*. 97.
- Villarreal, M., Villa, E. D., Cira, L., Estrada, M., Parra, F., & De los Santos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Vizcaino, L. (2015). *Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de frutilla (Fragaria chiloensis) en Checa - Pichincha* [Universidad San Francisco de Quito]. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/2666>
- Zaragoza, A. (Universidad de M. (2012). *Propiedades bioquímicas de tensioactivos biológicos de origen bacteriano*.
- Zendejas, G., Avalos, H., & Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades de patogenicidad, métodos de identificación. *Revista Biomed*, 25(3), 129–143. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>
- Zúñiga, I., & Caro, J. (2017). Enfermedades transmitidas por los alimentos: Una mirada puntual para el personal de salud. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 37(3), 95–104. <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2017/ei173e.pdf>

ANEXOS

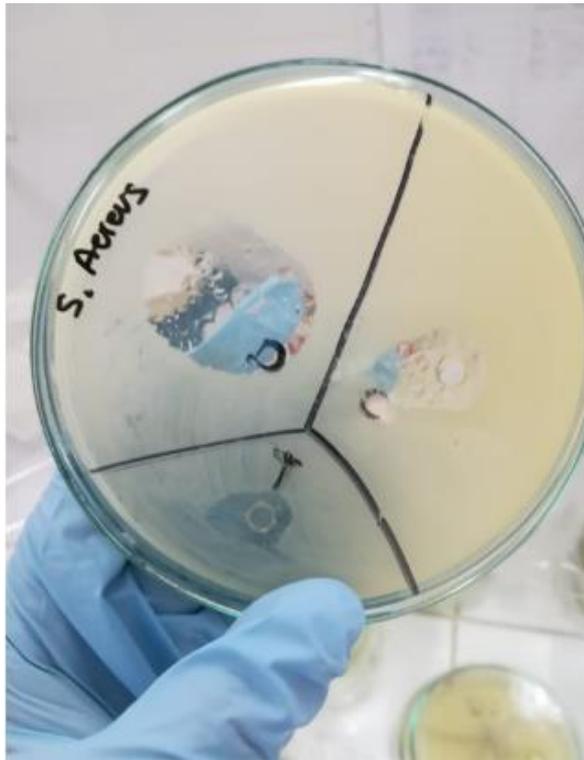
Anexo 1 Antibiograma de la muestra control de *Escherichia coli*



Anexo 2 Antibiograma de *Bacillus cereus* a una concentración del 60%



Anexo 3 Antibiograma de *Staphylococcus aureus* a una concentración del 60%



Anexo 4 Producción del biotensioactivo a partir de *Bacillus subtilis* DS23



Anexo 5 Liofilización del biotensioactivo



