

**EVALUACIÓN DE DESINFECTANTES PARA CONTROL DE
Geotrichum candidum EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE
Saccharomyces cerevisiae.**



**JENIFER PAOLA MENDOZA ISEDA
JESUS ENRIQUE HINCAPIE ACUÑA**

**UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR
FACULTAD CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA MICROBIOLOGÍA
VALLEDUPAR – CESAR
2023**

EVALUACIÓN DE DESINFECTANTES PARA CONTROL DE *Geotrichum candidum* EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae*.

**JENIFER PAOLA MENDOZA ISEDA
JESUS ENRIQUE HINCAPIE ACUÑA**

DEIVIS JHOAN GUTIERREZ MONTERO
Microbiólogo.
Microbiólogo, Magister en ingeniería agroindustrial

LINA MICHELLE ROJAS VALCARCEL
Microbióloga.
(Codirectora)

UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR
FACULTAD CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA MICROBIOLOGÍA
VALLEDUPAR – CESAR 2023

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Dedicatoria

Dedicamos esta tesis a las personas que han sido nuestra fuente constante de inspiración a lo largo de este arduo viaje. En primer lugar, a nuestros padres, especialmente a *Ana Edith Acuña Ospino*. Cuyo amor, apoyo inquebrantable, oraciones y sacrificio han sido la base para dar una educación y de cada logro en nuestra vida. A todos nuestros hermanos que han compartido risas y lágrimas a lo largo de esta travesía académica. A todos los que han influido positivamente en nuestro camino, este trabajo es un tributo a su impacto en nuestras vidas y un reflejo de mi profunda gratitud hacia ellos.

"La investigación consiste en ver lo que todos han visto y pensar lo que nadie más ha pensado." - Albert Szent-Györgyi

"El principio de la sabiduría es el temor de YHVH, Pero los insensatos desprecian la sabiduría y la instrucción". Proverbios 1:7

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro profundo agradecimiento a Dios y a todas las personas que contribuyeron de manera invaluable a la realización de esta tesis. En primer lugar, queremos agradecer a nuestros padres quienes con su gran esfuerzo y oraciones nos brindaron su apoyo, a nuestro Director, DEIVIS GUTIÉRREZ MONTERO y nuestra Co-directora LINA ROJAS VALCARCEL, por su orientación, apoyo y paciencia a lo largo de todo este proceso. Sus conocimientos y sabios consejos fueron fundamentales para dar forma a esta investigación y crecimiento. También quiero agradecer a mi familia por su apoyo inquebrantable y amor constante. A nuestros amigos, gracias por compartir esta travesía académica con nosotros y por brindarnos su aliento en los momentos más desafiantes. Finalmente agradecerle a la empresa la cual suministro el escenario y los materiales sin los cuales este proyecto no fuera un hecho. Este logro no habría sido posible sin todos ustedes.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	14
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN.....	18
<u>1.</u> EL PROBLEMA EN ESTUDIO	20
1.1. Título del estudio: Evaluación de desinfectantes para control de <i>Geotrichum candidum</i> en el proceso de producción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . 20	
1.2. Planteamiento del problema.....	20
1.2.1. Formulación del problema.	22
1.3. Justificación.....	23
1.4. OBJETIVOS	25
1.4.1. Objetivo general.....	25
2. MARCO TEÓRICO	26
2.1. Marco conceptual.	26
• <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
• Producción industrial de levaduras.	26
• Proceso de corte de levadura.	26
• Proceso de Limpieza y Desinfección.	27
• Agentes desinfectantes.....	27
• Contaminación microbiana.	27
• <i>Geotrichum candidum</i>	28
• Enfermedades transmitidas por alimentos.....	29
2.2. Antecedentes	30
2.3. Marco referencial.....	35
2.3.1. Inocuidad en la industria de alimentos.....	35
2.3.2. Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la levadura para la panificación.....	35
2.3.3. Limpieza y desinfección en la industria.	37
2.3.4. Características de un desinfectante.....	38
2.3.5. Agentes químicos que inhiben el crecimiento microbiano.	38
2.3.6. Mecanismo de acción de los agentes antimicrobianos.....	39

2.3.7. Resistencia microbiana contra los desinfectantes.	39
2.3.8. Desinfectantes utilizados en la industria de levaduras.	40
2.3.9. Técnicas para evaluar la eficiencia de desinfectantes en la industria de alimentos.....	43
2.4. Marco normativo.	45
3. METODOLOGÍA.....	46
3.1. Tipo de estudio y línea de investigación.	46
3.2. Universo, población (n) y localización de estudio.	46
3.3. Diseño metodológico.....	46
3.3.1. Determinar las fuentes de contaminación en fase de corte y empaque de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por <i>Geotrichum candidum</i>	46
3.3.2. Evaluar <i>in vitro</i> la concentración y tiempo de contacto de dos desinfectantes comerciales empleados en el proceso de corte y empaque, sobre la tasa de inhibición de <i>G. candidum</i>	56
3.3.3. Validar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para dos desinfectantes empleados en el proceso de desinfección en el área de corte y empaque de levadura.	60
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
4.1. Fuente de contaminación en fase de corte y empaque de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por <i>Geotrichum candidum</i>	62
4.1.3. Toma de muestras de producto terminado mediante la técnica de Pull. 67	
4.2. Evaluación <i>in vitro</i> de la concentración y tiempo de contacto de dos desinfectantes comerciales empleados en el proceso de corte y empaque, sobre la tasa de inhibición de <i>G. candidum</i>	69
4.3.1. Evaluación por Luminometría URL* (Unidades Relativas de Luz) <i>in situ</i>	73
5. CONCLUSIONES.....	75
6. RECOMENDACIONES.....	76
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	77
8. ANEXOS.....	

LISTA DE GRÁFICAS

- Gráfica 1. *Efecto de inhibición de Procide (Ácido peracético 18 % + Peróxido de hidrógeno 12 %) a los minutos (10, 15 y 20). Las concentraciones expresadas en 5000PPM = 0,5 % (v/v), 10000PPM = 1 % (v/v) y 15000PPM = 1,5 % (v/v).....55*
- Gráfica 2. *Efecto de inhibición de Logos (Ácido peracético 5 % + Peróxido de hidrógeno 15 % + Ácido acético 5 %) a los minutos (10, 15 y 20). Las concentraciones expresadas en 5000PPM = 0,5% (v/v), 10000PPM = 1 % (v/v) y 15000PPM = 1,5 % (v/v).....56*

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. <i>Factores asociados a la calidad microbiológica del producto final en fase de corte y empaque</i>	47
Figura 2. <i>Área de corte y empaque de levadura (Saccharomyces cerevisiae) comercial</i>	53
Figura 3. <i>Visualización microscópica y macroscópica del crecimiento de Geotrichum candidum en agar PDA aislado en fase de corte y empaque de levadura</i>	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. <i>Clasificación taxonómica de Geotrichum candidum</i>	26
Tabla 2. <i>Parámetros físico-químicos para levadura fresca (Saccharomyces cerevisiae) comercial</i>	34
Tabla 3. <i>Parámetros microbiológicos para levadura fresca (Saccharomyces cerevisiae) comercial</i>	35
Tabla 4. <i>Criterio de elección de un desinfectante para su uso en la industria de alimentos</i>	36
Tabla 5. <i>Principio activo de las soluciones químicas desinfectantes y uso en la industria</i>	38
Tabla 6. <i>Información técnica del microbiocida LOGOS™ 1120PA</i>	40
Tabla 7. <i>Información técnica de Procide (Ácido peracético 18 % + peróxido de hidrógeno 12 %)</i>	41
Tabla 8. <i>Criterios de muestreo para las superficies, ambientes y producto final , en fase corte y empaque de levadura</i>	47
Tabla 9. <i>Recuento e identificación de hongos y levaduras en manipuladores y superficies inertes</i>	50
Tabla 10. <i>Criterio de aceptación para la fase corte y empaque de la levadura fresca</i>	53
Tabla 11. <i>Criterio de aceptación para manipulador en planta de producción de levaduras comerciales</i>	54
Tabla 12. <i>Concentraciones de agentes químicos desinfectantes utilizados en los procesos de limpieza y desinfección contra G. candidum</i>	54
Tabla 13. <i>Tratamientos para evaluar por método de recuento en placa el desinfectante Microbiocida LOGOS™ 1120PA contra G. candidum a diferentes tiempos y concentraciones</i>	56
Tabla 14. <i>Tratamientos para evaluar por método de recuento en placa el desinfectante Procide contra G. candidum a diferentes tiempos y concentraciones</i>	57
Tabla 15. <i>Resultados de las muestras tomadas en los cuatro puntos estratégicos de monitoreo (Ambiente, Personal manipulador, Superficies utensilios/equipos y producto terminado) en el área de corte y empaque de la levadura Saccharomyces cerevisiae</i>	60

Tabla 16. *Resultados de validación in-situ de eficacia con Procide (ácido peracético 18 % + peróxido de hidrógeno 12 %) al 1 % (v/v) en un intervalo de 15 min de exposición.....70*

Tabla 17. *Resultados de la evaluación por Luminometría del CMI de Procide a una concentración del 1 % a 15 min contra G. candidum.....71*

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Resultados obtenidos de las muestras recolectadas de Ambientes, Personal manipulador, Superficies utensilios/equipos y producto terminado, para determinar la fuente de contaminación por <i>G. candidum</i>	87
Anexo 2. Resultados del recuento microbiano en (UFC/ml) del ensayo in vitro con Procide (Ácido peracético 18 % + Peróxido de hidrógeno 12 %).....	88
Anexo 3. Resultados del recuento microbiano en (UFC/ml) del ensayo in vitro con Logos (Ácido peracético 5 % + Peróxido de hidrógeno 15 % + Ácido acético 5 %).....	90
Anexo 4. Descripción macroscópica y microscópica de Hongos y Levaduras (HyL) presentes en el área de corte y empaque de levadura, aislados mediante muestreo de ambiente, hisopados y siembra en profundidad en etapas de monitoreo.	95
Anexo 5. Crecimiento en Agar PDA de <i>G. candidum</i> a las 48 h de incubación a 28 ± 2 °C, en el ensayo con los desinfectantes y grupo control.....	95
Anexo 6. Certificado de identificación de la cepa <i>G. candidum</i> por el laboratorio SYNLAB.....	95

ABREVIATURAS

ETAs: Enfermedades transmitidas por alimentos.

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PAHO/WHO: Organización Panamericana de la Salud.

USP: United States Pharmacopeial.

NTC: Normas Técnicas.

ICONTEC: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura.

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

URL: Unidades Relativas de Luz.

*Na**: No aplica.

PDA: Agar papa dextrosa.

RESUMEN

En el proceso de producción de la levadura desde su inicio en etapas de propagación en laboratorio, luego a escala industrial; fermentación en biorreactores, separación de mosto y levadura, acidificación, neutralización, prensado y corte y empaque de *Saccharomyces cerevisiae*, se puede dar la contaminación microbiológica, algunos de los microorganismos que pueden afectar el proceso de producción de la levadura son algunos agentes fúngicos como *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Verticillium* sp., *Alternaria* sp. y *Geotrichum candidum*. Esta investigación evaluó los tipos de desinfectantes como medida de control de *Geotrichum candidum* en fase de corte y empaque en el proceso de fabricación de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) comercial, para determinar cuál de ellos presenta mayor efectividad en la reducción de la contaminación fúngica. Inicialmente se hicieron varios raspados de las colonias del inóculo de *G. candidum* en cajas de Petri con agar PDA (Agar Papa Dextrosa) encontradas en equipos, superficies y ambientes del área de corte y empaque, posteriormente se añadió en un Erlenmeyer de 250 mL con 90 mL de caldo extracto de malta al 2 % estéril, para posteriormente optimizar a una concentración de 1×10^7 conidios*ml⁻¹ mediante cámara de Neubauer, se añadió a tubos de 15 mL con 8 mL de caldo de extracto de malta al 2 % estériles 1 mL de cada dilución de Procide (Ácido peracético 18% + Peróxido de hidrógeno 12%) y Logos (Ácido peracético 5% + Peróxido de hidrógeno 15% + Ácido acético 5%), así mismo se agregó la misma cantidad de una suspensión del microorganismo, la evaluación del efecto del desinfectante contra el crecimiento del hongo se realizó por medio de siembra por superficie en placa. Como resultado se obtuvo una eficacia del 100 % para las concentraciones utilizadas 1 % y 1,5 % y a los tiempos (10, 15 y 20 min) en la evaluación del efecto biocida con el desinfectante Procide (Ácido peracético 18 % + Peróxido de hidrógeno 12 %) contra el hongo. El estudio demostró alta presencia de mohos en toda el área de corte y empaque de *Saccharomyces cerevisiae*. Se identificó un total de 3 géneros de mohos en el área de corte y empaque de la levadura, clasificados como patógenos, estos fueron los siguientes: *Geotrichum candidum*, *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp. El crecimiento

de *G. candidum* se redujó con el desinfectante Procide en las diferentes concentraciones, a diferencia del microbiocida Logos que no logró una inhibición significativa en ningunos de los tratamiento evaluados, este presentó mayor el efecto cuando se utilizan altas concentraciones (1,5 %), al igual se pudo constatar que el uso de los mismos agentes químicos puede tenerse en cuenta como medida de control de contaminaciones fúngicas, no obstante, la concentración sugerida (1 %) fue suficiente y aportó un beneficio significativo al proceso de desinfección para mantener la inocuidad del producto final.

Palabras claves: alimentos, biocida, contaminación fúngica, inocuidad.

ABSTRACT

In the yeast production process, microbiological contamination can occur from very early stages. Some of the microorganisms that can affect the yeast production process include fungal agents such as molds. This research aims to evaluate the types of disinfectants as a measure to control *Geotrichum candidum* in the cutting and packaging phase of commercial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) manufacturing. The goal is to determine which of these disinfectants demonstrates the highest effectiveness in reducing fungal contamination. Initially, multiple scrapings of *G. candidum* colonies from Petri dishes with PDA agar (Potato Dextrose Agar) found on equipment, surfaces, and the cutting and packaging area environment were conducted. Subsequently, these were added to a 250 mL Erlenmeyer flask containing 90 mL of sterile 2 % malt extract broth. The concentration was then optimized to 1×10^7 conidia/ml using a Neubauer chamber. To assess the disinfectant's effect on fungal growth, 1 mL of each disinfectant dilution was added to 8 mL of sterile 2 % malt extract broth in 15 mL tubes, along with the same amount of a microorganism suspension. The evaluation of the biocidal effect of the disinfectant against the fungus was carried out through surface plating. As a result, a 100 % efficacy was achieved for the concentrations used (1 % and 1.5 %) and the various exposure times (10, 15, and 20 minutes) in the assessment of the biocidal effect with the disinfectant Procide (Peracetic Acid 18 % + Hydrogen Peroxide 12 %) against the fungus. The study demonstrated a high presence of molds in the entire cutting and packaging area of *Saccharomyces cerevisiae*. A total of 3 genera of molds were identified in the yeast cutting and packaging area, classified as pathogens, these were the following: *Geotrichum candidum*, *Penicillium* sp and *Aspergillus* sp. The growth of *G. candidum* was reduced with the Procide disinfectant at different concentrations, unlike the Logos microbiocide that did not achieve a significant inhibition in any of the treatments evaluated, this had a greater effect when high concentrations were used (1.5%), it was also possible to verify that the use of the same chemical agents can be taken into account as a measure to control fungal contamination, however, the suggested concentration (1%) was sufficient

and provided a significant benefit to the disinfection process to maintain the safety of the final product.

Keywords: biocide, food, fungal contamination, safety.

INTRODUCCIÓN

El proceso de producción de levadura panadera es un meticuloso y delicado procedimiento que involucra múltiples etapas de propagación y crecimiento, con la cepa de levadura como protagonista central. La levadura fresca es un elemento esencial en la industria de la panadería y la pastelería, desempeñando un papel fundamental en la fermentación de la masa y la obtención de productos horneados de alta calidad (González & Rey, 2017).

En el inicio de este proceso, la cepa de levadura se encuentra en pequeños tubos o cultivos iniciales. Aquí, se inicia el proceso de propagación, que es crucial para aumentar la cantidad de levadura disponible para su uso posterior. Para que la propagación de la cepa sea exitosa, es esencial crear condiciones óptimas en términos de pH de 4,0 a 4,5 (Held, 2010) y temperatura de 30 a 35 °C (Franco Andrade, 2019), lo que garantiza un entorno propicio para el crecimiento de las células de levadura. A medida que la cantidad de biomasa se incrementa de 0,3 gr (2 días) a 300 gr (4 días) en los cultivos iniciales, se realiza una transferencia escalonada a un biorreactor de 250 kg (5 días) a 20 – 30 toneladas (7 días). Por lo general, se requieren varios pasos de propagación, generalmente tres o cuatro, para alcanzar una cantidad satisfactoria de levadura que pueda ser utilizada en la producción a gran escala. (Di serio, et al., 2001, Guia-Feliche, 2019).

En la industria de la fabricación de levadura fresca comercial, un problema preocupante ha comenzado a surgir: la disminución de la efectividad de los desinfectantes Procide (Ácido peracético 18% + Peróxido de hidrógeno 12%) y Logos (Ácido peracético 5% + Peróxido de hidrógeno 15% + Ácido acético 5%), utilizados en la limpieza de los entornos, equipos y áreas de trabajo (Gálvez, 2022). Esta inquietante situación se manifestó en forma de un crecimiento desafiante del microorganismo *Geotrichum candidum*, cuya presencia se ha detectado en la etapa de evaluación de lotes de productos terminados, justo antes de su liberación al mercado. Este fenómeno plantea una serie de interrogantes sobre la eficacia de los protocolos de limpieza y desinfección empleados en la industria de la levadura fresca (García, 2021).

Para abordar esta problemática y asegurar la calidad y seguridad de los productos, resulto imperativo llevar a cabo una evaluación exhaustiva del programa de rotación de desinfección y limpieza. Este programa está diseñado específicamente para eliminar o reducir la carga microbiana presente en los equipos, superficies y entornos en los que se desarrollan los diversos procesos de corte y empaque de la levadura fresca. El análisis de este programa es esencial para comprender la raíz del problema y desarrollar estrategias efectivas que eviten la proliferación de microorganismos no deseados en la cadena de producción (Magdovitz et al., 2022).

Este desafío plantea cuestiones críticas sobre la seguridad alimentaria, la calidad del producto y la integridad de la marca en la industria de la levadura fresca comercial. La resolución de esta problemática no solo es vital desde una perspectiva regulatoria, sino que también es esencial para mantener la confianza de los consumidores en la excelencia de los productos ofrecidos. Teniendo en cuenta lo mencionado, el presente trabajo tuvo por objetivo evaluar cuáles son las concentraciones óptimas de los desinfectantes industriales utilizados en el proceso de limpieza y desinfección en la fase de corte y empaque que demuestran mejoras significativas en la reducción de la contaminación con *G. candidum*.

1. EL PROBLEMA EN ESTUDIO

1.1. Título del estudio: Evaluación de desinfectantes para control de *Geotrichum candidum* en el proceso de producción de *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2. Planteamiento del problema.

La producción biomasa a escala industrial de *S. cerevisiae* es un proceso que actualmente representa gran interés económico y una industria en creciente aumento, el cual representó para Colombia con un producto interno bruto (PIB) de 6.250 Miles de millones de pesos DANE (2022), esto dado por ejemplo a industrias manufacturera (o de producción) de panificados (Mejía-Barajas, 2016), ya que la biomasa generada por *Saccharomyces cerevisiae* en biorreactores representa la mayor producción a granel que cualquier otro microorganismo en el mundo, con una producción anual de 18.600 ton/año, solo en Colombia aproximadamente (datos no publicados).

El proceso de producción de levadura panadera, conlleva diferentes pasos de propagación en el cual para la cepa su principal fuente de carbono es suministrada principalmente por la sacarosa o en algunos casos por la glucosa, las cuales son obtenidas principalmente de la melaza de caña de azúcar (Guia-Feliche, 2019). Su propagación comienza desde pequeños tubos donde se agrega una alícuota de levadura con la cantidad necesaria de nutrientes y en condiciones óptimas de pH de 4,0 a 4,5 (Held, 2010) y temperatura 30 a 35 °C (Franco Andrade, 2019). Una vez que la cantidad de células es lo suficientemente grande, de forma escalonada se transfiere a un biorreactor para un mayor crecimiento; por lo general se necesitan cuatro o cinco pasos para obtener una cantidad satisfactoria de salida (Di serio, et al., 2001).

Uno de los problemas en la industria de la levadura durante los procesos de generación de biomasa a través de la manufacturación, es la contaminación microbiana, que puede ocurrir debido a una gran variedad de microorganismo, tales como levaduras salvajes, bacterias ácido lácticas, Coliformes y *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* sp., *estafilococos*, bacilos esporulados y mohos (Mendoza-Cedeño y Párraga-Sabando, 2021) los cuales son eje de seguimiento en cada paso de fabricación hasta su embalaje y comprensión.

La ocurrencia de algunas falencias en el sistema de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) son un factor de deterioro en todos los aspectos en relación con la fabricación y etapas de producción. Para contrarrestar los peligros que se puedan dar en el momento de la elaboración del producto a manera de ejemplo se da la contaminación cruzada, que puede consistir en un cruce de materia prima no desinfectada con empaques que serán utilizados para el producto final y que no conllevan un proceso de sanitización, o por personal manipulador en la fase corte que presenten deficiencias en el lavado de manos (Betoret-Valls, 2021; PAHO, 2023). Cuando no se manejan BPM se llega a afectar al consumidor final de forma negativa permitiendo el resguardo a la salubridad del consumidor, estas prácticas están diseñada para prevenir o minimizar los riesgos asociados con la producción y se aplican en diversas industrias, como la alimentaria, farmacéutica, cosmética y dispositivos médicos, entre otros. Siendo entonces el objetivo principal de las BPM prevenir y controlar los riesgos asociados con la producción de productos, garantizando que se cumplan los estándares de calidad y seguridad alimentaria (Safetyculture, 2021; Huánuco-Azabache., Cevallos-Ampuero y Campos-Contreras, C. 2021)

En el proceso de producción de la levadura, la contaminación microbiológica puede darse desde etapas muy tempranas, algunos de los microorganismos que pueden afectar el proceso de producción de la levadura son algunos agentes fúngicos como mohos del género *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Verticillum* sp., *Alternaria* sp.,(Kawtharani, 2022) y *Geotrichum candidum*, el cual éste en especial es un hongo filamentoso que su presencia en la levadura fresca causa un deterioro sensorial presentándose como una capa blanca de polvo en toda la superficie externa de la levadura (Muñoz & Armando, 2021).

Para el control de especies microbiana intrusas, se realizan procesos de limpieza y desinfección que son procedimientos operacionales estandarizados que contribuyen conjuntamente con las BPM del personal de fabricación a reducir al mínimo los peligros asociados al deterioro de los alimentos, estos procedimientos involucran acciones de barrido y eliminación superficial de materiales extraños en superficies inertes como medida inicial y seguido de técnicas físicas y químicas que permiten inactivar, eliminar, matar o inhibir un

gran número de poblaciones no deseadas encontrados en el ambiente de fabricación, mediante la aplicación de biocidas o germicidas, sustancias químicas antimicrobianas cuyos mecanismos de acción y resistencia son muy similares a los de los antibióticos (Hernández-Navarrete et al., 2014; Capacho, 2019; Gómez, y Doñate, 2019), y en su mayoría de naturaleza química (Rabán, y Claudia, 2021)., Hernández-Navarrete et al., (2014) menciona la ocurrencia de la adquisición de resistencia de cepas microbiana a desinfectantes y agentes biocidas por la generación de resistencia que puede ser una propiedad natural (intrínseca o innata), y entonces se habla de no susceptibilidad, o una resistencia adquirida. Chacón-Jiménez y Rojas-Jiménez (2020)., mencionan que una cepa microbiana es resistente cuando la concentración mínima inhibitoria (CMI) que presenta es superior a la concentración de trabajo del biocida empleado, de acuerdo a las concentraciones sugerida por el fabricante, siendo las concentraciones de los biocidas el factor más relevante para la definición de la resistencia microbiana. Por lo cual, es indispensable en las industrias alimentarias el estudio sobre la resistencia a biocidas basadas en los hallazgos del CMI.

En la fabricación de levadura fresca comercial de la industria se ha evidenciado una disminución en la efectividad de los desinfectantes utilizados para la limpieza del ambiente, equipos y lugares de trabajo, contra el crecimiento *G. candidum*, el cual su presencia se ha evidenciado en la etapa de evaluación de lotes del producto terminado antes de su liberación. Por lo tanto, es necesario evaluar el programa de rotación de desinfección y limpieza dirigido a eliminar o reducir la carga microbiana en los equipos, superficies y ambientes donde se realizan los diversos procesos de corte.

1.2.1. Formulación del problema.

¿Cuáles son las concentraciones óptimas de los desinfectantes industriales utilizados en el proceso de limpieza y desinfección en la fase de corte y empaque que demuestran mejoras significativas en la reducción de la contaminación con *G. candidum*?

1.3. Justificación.

Actualmente las empresas productoras y comercializadoras de alimentos manejan dentro de su gestión, procesos que involucran conceptos de higiene que representan la inocuidad, siendo esta un aspecto de estricto cumplimiento para el mantenimiento de la salud pública y elemento esencial para la gestión de la calidad total, por lo cual es tema de alta prioridad para todos los países y gobiernos (Ibarra, 2017). Es por eso, que los países y empresas han enfocado todas sus estrategias no solamente para el mejoramiento de la salud pública con mejorar la inocuidad, sino también para poder ingresar a mercados más competitivos, y por ende, cumplir con las regulaciones normativas en materia de inocuidad alimentaria.

La inocuidad alimentaria está asociada a los productos que se encuentran libres de riesgos y peligros químicos, físicos o microbiológicos y que no provocarán ningún daño a la salud de los consumidores. Las preocupaciones concretas sobre los riesgos alimentarios que se estima actualmente en todas las etapas de la cadena de producción de alimentos, se han centrado en general en los siguientes aspectos: riesgos microbiológicos; el cual esta asociados a la capacidad patogénica de los microorganismos presentes en los alimentos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declara que en las Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), encabezan aquellas que conllevan procesos diarreicos que son responsables de más de la mitad de la carga mundial de ETAs, ocasionando que 550 millones de personas enfermen y 230 mueran cada año, (OMS, 2021). A nivel nacional el Instituto Nacional de Salud dispone las cifras de ETAs para el año 2021, las cuales presentaron 684 brotes con un total de 7952 personas afectadas, teniendo un aumento del 33 % en comparación con el año inmediatamente anterior (INS, 2022). Los principales patógenos asociados a las ETAs en América es Norovirus, *Campylobacter*, *Escherichia coli* y *Salmonella* no tifoidea que causan el 95 % de los casos (WHO's, 2022). Por consiguiente, es notable la importancia del estudio microbiológico de los que afectan la inocuidad de los alimentos. Así mismo, no solo los alimentos sufren alteraciones a nivel microbiológico, también están los residuos de plaguicidas, utilización inadecuada de los aditivos alimentarios, contaminantes químicos;

incluidas las toxinas biológicas, adulteración y contaminación física (Duque & Calderón, 2018).

Las empresas productoras de levadura para panificación deben proporcionar al mercado un producto final con parámetros microbiológicos (Tabla 3) y nutricionales aceptables (Tabla 2), estos deben ser asegurados en cada etapa del proceso, desde el transporte y recepción de materia prima, hasta la fase de corte y empaque de la levadura. La base para la producción de alimentos inocuos, considerando este concepto da la garantía de que los alimentos no causen daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman según el Codex Alimentarius (FAO, 2021). Por lo cual los procesos de limpieza y desinfección llevados en cada etapa de la producción deben cumplir las especificaciones necesarias para evitar y prevenir la presencia de microorganismos patógenos contaminantes, y así mismo tomar acciones correctivas de investigación para controlar y eliminar cualquier microorganismo que se presente fuera de los parámetros. Es así, que nace la responsabilidad del área del laboratorio de microbiología evaluar los agentes desinfectantes en los procesos de saneamiento, específicamente en el área de corte y empaque de levadura, ya que el no tomar acciones correctivas del producto final, al ser comercializado puede generar consecuencias al ser humano y pérdidas económicas significativas.

Por consiguiente, se hace necesario realizar un estudio para evaluar diversas concentraciones de dos desinfectantes para implementar en el área de corte y empaque de la levadura, los cuales garanticen que los procesos de desinfección sean efectivos y no se genere contaminación en los productos terminados por *Geotrichum candidum* y determinar qué factores favorecen la incidencia y presencia de este microorganismo intruso el cual llega a tener gran importancia en la producción de la levadura, en últimas, si se realiza una validación de manera adecuada traerá mayor rentabilidad e inocuidad en los procesos realizados en la planta de producción de *Saccharomyces cerevisiae*.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general.

Evaluar los tipos de desinfectantes como medida de control de *Geotrichum candidum* en fase de corte y empaque en el proceso de fabricación de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) comercial.

1.4.2. Objetivos específicos.

- Determinar las fuentes de contaminación en fase de corte y empaque por *Geotrichum candidum*.
- Evaluar in vitro la concentración y tiempo de contacto de dos desinfectantes comerciales empleados en el proceso de corte y empaque, sobre la tasa de inhibición de *G. candidum*.
- Validar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para dos desinfectantes empleados en el proceso de desinfección en el área de corte y empaque.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Marco conceptual.

- ***Saccharomyces cerevisiae*.**

Saccharomyces cerevisiae, es una levadura que constituye el grupo de microorganismos más relacionado asociado al progreso y bienestar de la humanidad debido a su gran uso en la panificación e industrias de fabricación de vinos, alcohol y cervezas; su nombre proviene del vocablo Saccharo (azúcar), myces (hongo) y cerevisiae (cerveza). Es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa (Parapouli, Vasileiadis, Afendra y Hatziloukas, 2020).

Taxonómicamente pertenece al Phylum: *Ascomycota*, a la Clase: *Hemiascomycetes*, del Orden: *Saccharomycetales* y de la familia de las *Saccharomycetaceae*, también es un hongo levaduriforme de pared lisa en su interior, que presenta células alargadas, globoides a elipsoidales con gemaciones (Pilco et al., 2023).

- **Producción industrial de levaduras.**

Los antecedentes de la industria de panificación vienen desde la antigüedad y han tomado gran relevancia en la alimentación humana, las panaderías tradicionales son el mayor sector consumidor de levadura en el país. Las empresas de panificación industrial también son fuertes demandantes de levadura. Algunos establecimientos prefieren utilizar levadura seca y/o instantánea porque poseen una mayor vida útil y les resultan más convenientes para el almacenamiento. La levadura es un ingrediente principal al momento de la fabricación ya que es el encargado de la fermentación de la masa, aportando también condiciones organolépticas al producto (García & Carolina, 2021).

- **Proceso de corte de levadura.**

La levadura en el proceso de fabricación pasa por diferentes etapas, desde su fermentación hasta el moldeado, en el proceso de corte la levadura se moldea, corta y empaca, su proceso comienza cuando cae a la mezcladora ya solidificada, pasa a la moldeadora donde es mezclada con aceite vegetal y se

le da la forma de bloque para así posteriormente por medio de una banda transportadora, los bloques llegan al sistema de envoltura automática en papel parafinado las cuales serán empacadas en cajas, por último, se almacenan en un cuarto frío para mantener una temperatura inferior a los 5 °C (Llanos & Capera, 2019).

- **Proceso de Limpieza y Desinfección.**

Para lograr una buena calidad e inocuidad de un producto alimentario hay que ejecutar un plan o estrategias de limpieza y desinfección que junto con las buenas prácticas de manufactura de los operadores de las industrias minimicen el peligro de contaminación. Por lo tanto, definir de forma clara y precisa las estrategias de limpieza y desinfección son de mucha relevancia, se han desarrollado protocolos, sistemas de gestión de calidad, procedimientos al interior de las empresas, sobre estos procesos que han sido documentados para dar soporte a la realización de productos para el consumo humano (Betoret et al., 2021).

- **Agentes desinfectantes.**

Los desinfectantes son biocidas que ayudan a eliminar, reducir, neutralizar, disminuir la acción o ejercer un control sobre microorganismos como hongos, levaduras y bacterias en equipos, utensilios y superficies gracias a su composición, eliminando el peligro biológico del producto y asegurando una calidad e inocuidad (Diario Oficial de la Unión Europea, 2012).

- **Contaminación microbiana.**

La contaminación microbiana es uno de los problemas más graves que se da frecuentemente en condiciones in vitro por los hongos, las bacterias y levaduras, cuando existe la presencia de cualquier característica intrínseca o extrínseca anormal en el alimento que conlleve a la pérdida de su calidad o condiciones organolépticas, ya sea para el consumo humano o animal debido a un tratamiento incorrecto o indebido durante se fabricación, obtención, transformación, almacenamiento, e incluso en su preparación, causa afectaciones de alto riesgo. La contaminación de estos microorganismos se da

por su multiplicación incontrolada, que representa la causa más frecuente de enfermedades de transmisión alimentaria (Hernández & Gonzalez, 2010).

- ***Geotrichum candidum*.**

Geotrichum candidum tiene mucha diversidad tanto fenotípica como genotípica que dificulta su clasificación, sobre si considerarlo un hongo con apariencia de levadura o filamentoso (Boutrou y Guéguen, 2005). Es un microorganismo importante en la industria agroalimentaria ya que forma parte integral de la microflora nativa de algunos productos como la leche cruda, este agente fúngico está también caracterizado como un organismo comensal del sistema digestivo humano y animal (Gente, et al., 2006).

Sin embargo, su importancia no se limita por componente deseable de la flora superficial de quesos prensados y quesos madurados con moho blando o manchados, sino que también afecta negativamente y significativamente a las propiedades organolépticas y químicas de la levadura fresca comercial (Koňuchová y Balík, 2021), al igual se ha observado como contaminante en tortas refrigeradas y en hortalizas de hoja congeladas y provoca una pudrición acuosa, espesa o pegajosa (Eliskases-Lechner, 2022).

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de Geotrichum candidum. Se establece de acuerdo:

Clasificación Taxonómica		Estado teleomórfico	Estado anamórfico
Filo: <i>Ascomycota</i>	Familia	<i>Dipodascaceae</i>	<i>Candidaceae</i>
Clase: <i>Hemiascomycetes</i>	Género	<i>Galactomyces</i>	<i>Geotrichum</i>
Orden: <i>Saccaromycetales</i>	Especie	<i>G. candidus</i>	<i>G. candidum</i>

Nota: Sottier et al., (2008). Clasificación taxonómica de *Geotrichum candidum*, y su división de acuerdo a su morfología.

Recientemente, en 2022, según la base de datos Catalogue of Life, se ha establecido " *Dipodascus geotrichum* (E.E. Butler & L.J. Petersen) Arx (von Arx, 1977) como el nombre de la especie más adecuado.

- **Enfermedades transmitidas por alimentos.**

Las enfermedades transmitidas por alimentos son en su mayoría provocadas por la ingestión de alimentos con alta carga de contaminantes microbianos dadas por un mal manejo de los alimentos al momento de su producción o preparación, malas prácticas de manufactura por el operario, entre otras. Los microorganismos como las bacterias, los hongos mediante una invasión, multiplicación y expansión en los tejidos del huésped, estos son en general responsables de la mayoría de ETAs produciendo síntomas gastrointestinales como vómito, diarrea, dolor abdominal entre otros (Fernández et al., 2021).

La capacidad patogénica de *Geotrichum candidum* a nivel clínico humano aún no se define claramente, pero hay reportes literarios donde la morfología que preside a las enfermedades es forma de levadura y denominada como Geotricosis (Ghosh, y Boler, 2020). Myint, et al., (2015), reporta infecciones renales y sepsis en pacientes con enfermedades diseminadas e infecciones. Las infecciones por este hongo son clínicamente similares a la candidiasis (Prakash, 2012), y generalmente se adquieren por ingestión o inhalación (Keene, 2019).

2.2. Antecedentes

Chou, et al., (2023), el estudio realizado en Taiwán muestra que el deterioro de los alimentos debido a la contaminación por moho posterior al horneado es una preocupación importante en la industria de la panadería. El moho es un tipo de hongo que puede crecer en una amplia variedad de alimentos, incluyendo panes, pasteles y otros productos horneados. La presencia de moho en los alimentos puede resultar en la producción de toxinas que pueden ser perjudiciales para la salud, así como en la alteración del sabor y la textura de los productos horneados. La contaminación por moho en la industria de la panadería puede ocurrir en diferentes etapas del proceso de producción, incluyendo durante el almacenamiento de los ingredientes, la fermentación de la masa, el horneado y el almacenamiento de los productos horneados. El control de la contaminación por moho es fundamental para garantizar la calidad y la seguridad de los productos horneados, así como para proteger la salud de los consumidores. Las medidas para prevenir la contaminación por moho en la industria de la panadería incluyen la implementación de buenas prácticas de higiene, la utilización de ingredientes frescos y de calidad, el control de la temperatura y la humedad durante el almacenamiento y la producción, y la realización de pruebas regulares para detectar la presencia de moho en los productos horneados.

Para Ordoñez, et al., (2021), el principal propósito de su investigación fue evaluar la eficacia de varios desinfectantes comerciales, en función de la concentración y el tiempo de contacto, frente a un amplio espectro de cepas de *Fusarium* spp., en conexión con la estrategia de prevención ante la eventual entrada de éste patógeno al país, donde los compuestos de amonio cuaternario y los del grupo de los aldehídos son dos tipos de desinfectantes químicos utilizados en esta investigación para reducir la contaminación microbiana en superficies y utensilios. Estos desinfectantes actúan de diferentes maneras para eliminar microorganismos patógenos y reducir la carga bacteriana en las superficies. Asimismo, se comprobó que el efecto desinfectante de los productos mejora a medida que pasa el tiempo de exposición, y disminuye al diluirse.

Ortiz, et al., (2020) evaluó la aplicabilidad de diferentes sanitizantes químicos (ácido peracético, peróxido de hidrógeno, ácido cítrico, ácido láctico y

ácido acético) para la inactivación de *S. enterica*, *L. monocytogenes* y Norovirus murino en fresas donde obtuvieron resultados que evidenciaron que el ácido peracético (PA) fue efectivo para el lavado de agua y desinfección de frutos. La adición de desinfectantes a los lavados con agua es una de las estrategias más comúnmente estudiadas para eliminar o inactivar patógenos en las fresas, así como para evitar la contaminación cruzada debido a la reutilización del agua de lavado del proceso.

Estudios más recientes han analizado el efecto de la combinación del ácido peracético con otros desinfectantes. Martínez Hernández et al., (2015) en España, mostraron que sobre *E. coli* y *S. enteritidis* inoculadas en kailan-brócoli se logró una reducción de recuentos del orden 2,3 a 1,2 unidades log después de 14 días a 5 °C, cuando el producto se trató con una combinación de ácido peracético y agua electrolizada.

Hernández-Navarrete et al., (2014), En España menciona en su estudio "Fundamentos de antiseptia, desinfección y esterilización" que el área a desinfectar, el grado de aplicación, así como la duración de la exposición, pueden afectar a las poblaciones de aerobios, bacterias como *E. coli* en diferentes superficies. Junto con esto, es importante asegurarse de que todas las superficies y los materiales orgánicos vacíos se limpien para las pruebas de campo antes de aplicar el desinfectante.

En el estudio de Martínez, R. (2013), realizado en Perú se destaca que la presencia común de patógenos, incluyendo hongos, en alimentos es natural debido a su prevalencia en el medio ambiente. No todos son igualmente peligrosos, pero para prevenir la contaminación, se enfatiza la importancia de seguir buenas prácticas de higiene en todas las etapas de la cadena alimentaria. Esto implica medidas de control en producción, transporte y almacenamiento, así como la educación de los consumidores sobre la manipulación adecuada de alimentos. Los hongos pueden ser responsables de la contaminación primaria, especialmente en condiciones propicias para su crecimiento, mientras que la contaminación secundaria puede surgir por condiciones inadecuadas de almacenamiento, siendo crítico en el caso de hongos productores de toxinas, que pueden persistir incluso después de eliminar los hongos.

La contaminación secundaria ocurre cuando los microorganismos que ya están presentes en los alimentos comienzan a crecer y multiplicarse, debido a condiciones ambientales inadecuadas, como la falta de refrigeración o el almacenamiento prolongado. Esto representa un problema en el caso de hongos que producen toxinas, ya que incluso si se eliminan los hongos, las toxinas pueden permanecer en el alimento y causar enfermedades.

Kyanko, M. et al. (2010), en su estudio realizado en Argentina “Efectividad del ácido peracético sobre la reducción de la carga de esporas de mohos causantes de pudrición pos-cosecha de frutas y hortalizas”. Se estimó *in vitro* la efectividad del ácido peracético sobre la disminución de esporas de mohos micotoxigénicos causantes de pudrición de frutas y hortalizas, para determinar su potencial aplicación al control pos-cosecha. Se evaluaron tres concentraciones de ácido (0.05 %, 0.1 % y 0.3 %) para determinar su capacidad antifúngica. El uso del ácido peracético resulta una alternativa no contaminante para el tratamiento de pudrición por hongos después de la cosecha de los frutos. Se ha observado disminuciones de la carga microbiológica de esporas aún a la más baja concentración probadas, efecto que incrementó con el aumento de la concentración del tratamiento. A una concentración del 0.3 % se obtuvo una mayor reducción de la carga de esporas viables.

Valencia-Montero y Acero-Plaza (2013), en Colombia implementaron una herramienta para contribuir con la seguridad alimentaria y la disminución de las enfermedades transmitidas por alimentos, como complemento a la aplicación de las buenas prácticas de manufactura que deben estar implementadas antes y durante el proceso de obtención del producto final. La metodología que implementaron fue un muestreo en instalaciones de un frigorífico con canales bovinas. Los tratamientos utilizados para evaluar la desinfección fueron ácido láctico (AL) a 0,5-0,9 %, ácido peroxiacético (AP), e hipoclorito de sodio (HS) durante veinte segundos.

El número de muestras fue de 78 canales en total, se seleccionaron canales bovinas visualmente contaminadas con contenido gastrointestinal, la misma canal fue muestreada mediante frotis en el pecho, el brazo o la espalda, los análisis microbiológicos que se le realizaron fueron determinación de *Salmonella* spp. y *E. coli* en sus medios de cultivos específicos incubados por 24

horas a una temperatura de 35 °C a 37 °C. Ya en los resultados solo se encontró *E. coli* y en todas muestras evaluadas no se evidenció la presencia de *Salmonella* spp. Se evidenciaron los siguientes de datos 1,12, 1,64 y 1,23 log₁₀ UFC/cm² antes de aplicar los desinfectantes (AL, AP y HS) y después de aplicación de los desinfectantes para AL, AP y HS fueron 0,07, 0,26 y 0,21 log₁₀ UFC/cm², encontrando que no hubo diferencia entre los tratamientos y que los tres son eficaces en la desinfección de canales bovinas. Recomiendan que para el control de las BPM y de otros procesos no es suficiente en la disminución de agente contaminantes, en algunos casos patógenos, por lo que se propone la aplicación agentes desinfectantes autorizados como medios para la eliminación o reducción especies intrusas en los procesos de manufactura.

Valencia-Villareal, (2017), en Colombia evaluaron la eficacia de los procedimientos de limpieza y desinfección en la gestión de saneamiento de los laboratorios del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad de Santander Campus Cúcuta. Se llevó a cabo una investigación de campo que abarcó seis laboratorios, analizando los procesos de limpieza y desinfección. Los resultados destacados incluyen que, según la lista de chequeo, el 80% en la categoría de Control y el 67% en Sanidad obtuvieron resultados negativos. Los Aerobios mesófilos mostraron la mayor carga microbiana antes y después de la intervención. La concentración óptima de hipoclorito in vitro y la más efectiva in vivo es del 3%. Se concluye que los procesos actuales no son efectivos, siendo necesario mejorar aspectos relacionados con la sanidad y el control.

Villanueva, (2016), en Colombia examinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la eficacia de dos desinfectantes: el Peróxido de Hidrógeno al 7,5%, utilizado en entornos hospitalarios, y el Pursue (Amway), de uso comercial. Estos desinfectantes fueron evaluados en la eliminación de agentes patógenos en equipos, instrumentos y superficies. La CMI del peróxido de hidrógeno que se implementaron fueron de 14,6 mg/L para *Salmonella tiphy*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que para el desinfectante Pursue fue de 190 mg/L para *Staphylococcus aureus*, 95 mg/L para *Salmonella tiphy* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se utilizó la técnica de placa en agar con hisopos y siembra por estría para determinar la efectividad de los desinfectantes. Se

seleccionaron aleatoriamente seis lugares en la central de mezclas de un hospital nivel IV para la toma de muestras, y los resultados fueron analizados mediante técnicas estadísticas, destacando el muestreo aleatorio simple para estimar proporciones (MAS). Los resultados indicaron que el Peróxido de Hidrógeno al 7,5% es eficaz contra *Salmonella tiphy*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, y que el desinfectante comercial Pursue elimina bacterias de uso hospitalario.

2.3. Marco referencial.

2.3.1. Inocuidad en la industria de alimentos.

Podemos definir la inocuidad alimentaria como el conjunto de condiciones y medidas necesarias durante la producción, almacenamiento, distribución y preparación de los alimentos para asegurar que su consumo sea seguro con características de excelente calidad e inocuidad que garanticen el cumplimiento de los requisitos y expectativa de los clientes, asegurando a su vez el cumplimiento de los requisitos legales y reglamentarios, a través de la eficacia y mejora continuidad del sistema de gestión de calidad e inocuidad.

La calidad de los productos radica en el nivel de peligros que este pueda causar al ser consumido, dentro de los puntos críticos se encuentran los peligros químicos por causa de contaminación con productos ajenos al mismo como desinfectantes o alérgenos.

En cuanto a peligros físicos, se puede determinar que son fácilmente detectados a nivel visual como materiales metálicos, pedazos de papel, astillas de madera, entre otros, también se encuentran los peligros microbiológicos, que a nivel correctivo son detectados hasta que cause un malestar o enfermedad en el consumidor, como los microorganismos patógenos entre ellos *Escherichia coli*. De acuerdo a lo anterior, la inocuidad es el factor principal a tener en cuenta para que un producto sea transportado y comercializado en la industria de manera eficaz, eficiente y efectiva (King, et al., 2017; Beltran, 2018).

2.3.2. Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la levadura para la panificación.

La Norma Técnica Colombiana (NTC) 1807, establece los requisitos que debe cumplir la levadura para panificación y los métodos de ensayo a los cuales ésta debe someterse. La presente norma sanitaria busca resguardar la salud de los compradores, situando las exigencias saludables que deben verificar los productos de levadura para panificación y los establecimientos que los fabrican, elaboran y venden. Esta norma tiene un ámbito de aplicación para toda razón social que provee productos de panificación a nivel nacional. Puesto que hay comités supervisores establecidos por las municipalidades para que fiscalicen si

encuentran los productos en condiciones de alterar la salud, en esta se miden los criterios fisicoquímicos y microbiológicos (ICONTEC, 2012).

Los parámetros fisicoquímicos se presentan en la Tabla 2, se establecen con el propósito de promover la calidad de los productos y la protección de la salud, en este parámetro se realizan pruebas donde se examinan el nivel de humedad, entre otros (Ayala, 2018).

Existen criterios microbiológicos se presentan en la Tabla 3, la calidad que deben cumplir los productos, teniendo dominación las autoridades sanitarias para exigir criterios debidamente sustentados para la protección de la salud. Para ello se hacen ciertas pruebas microbiológicas para determinar la presencia bacteriana tales como: levaduras, mohos, coliformes y aerobios mesófilos (Portales, 2020).

Tabla 2.

*Parámetros físico-químicos para levadura fresca (*Saccharomyces cerevisiae*) comercial.*

Parámetros	Método	Especificación	Norma
% Humedad	Estufa 105 °C-16h	65.5 % - 70 %	NTC 1807
% Nitrógeno proteico en base seca	Kjeldahl	≥ 40 %	NTC 1807
% Fósforo como P ₂ O ₅ en base seca	Espectrofotómetro	≥ 1,5 %	NTC 1807
pH solución al 10%	Potenciómetro	≥ 3,5	NTC 1807

Nota: Especificaciones físico-químicos aceptables en la producción a escala industrial de *Saccharomyces cerevisiae* de acuerdo a la NTC 1807 establecidas en las plantas de producción. Y métodos de detección en laboratorios.

Tabla 3.

Parámetros microbiológicos para levadura fresca (Saccharomyces cerevisiae) comercial.

Parámetros	Método	Especificación	Norma
Bacterias Mesófilas UFC/g	Recuento en Placa	<10 ⁸	NTC 1807
<i>E.coli</i> UFC/g	Recuento en Placa	<10	NTC 1807
Mohos/ <i>Geotrichum candidum</i>	Recuento en Placa	<100	NTC 1807
<i>Salmonella</i> UFC/25 g	Recuento en Placa	Ausencia	NTC 1807

Nota: Especificaciones microbiológicas aceptables en la producción a escala industrial de *Saccharomyces cerevisiae* de acuerdo a la NTC 1807 establecidas en las plantas de producción. Y métodos de detección en laboratorios.

2.3.3. Limpieza y desinfección en la industria.

En la industria siempre se ha buscado la eliminación o reducción de microorganismos contaminantes en equipos, utensilios, manipuladores, superficies y ambiente mediante la implementación de procedimientos de limpieza y desinfección en los diferentes procesos. La reducción o eliminación total de estos microorganismos está dada por las superficies que entran en contacto con el producto en su proceso de elaboración, los restos de producto o materia prima adheridos a utensilios o equipos que son retirados mediante la acción mecánica, entre otros. Para obtener una buena limpieza y desinfección en estos lugares es de suma importancia conocer los diferentes factores o riesgos contaminantes para así poder implementar una adecuada prevención y control. Como mencionamos anteriormente los principales contaminantes son los utensilios, el personal, el sistema de aire, superficies e instalaciones utilizados durante todo el proceso (Alba & Araujo, 2008).

La desinfección es un proceso químico que tiene como fin eliminar, matar, inactivar o inhibir a un gran número de microorganismos potencialmente patógenos, como bacterias, hongos y protozoos. Se requiere de un control y

vigilancia durante todo el proceso para una desinfección efectiva. En la actualidad se busca que estos sean los más tóxicos para los microorganismos, pero con efectos nocivos mínimos en el ambiente y hombre (Oeste et al., 2018).

2.3.4. Características de un desinfectante

Un desinfectante debería cumplir con las siguientes características para su elección (Tabla 4):

Tabla 4.

Criterio de elección de un desinfectante para su uso en la industria de alimentos.

Alta solubilidad	Disponibilidad
Estabilidad conveniente	Capacidad para penetrar
No corrosivo	Inoloro u olor agradable
Baja toxicidad	No generar resistencia
Amplia acción	Alta homogeneidad

Nota: Rodríguez, E. (2015)., describe los criterios que las industrias de alimentos deben tener para los antisépticos y desinfectantes antes de su uso.

2.3.5. Agentes químicos que inhiben el crecimiento microbiano.

Los agentes químicos son sustancias químicas que influyen negativamente sobre los microorganismos, pudiendo ejercer dos tipos de efectos diferentes, inhibir el crecimiento o destruir totalmente el microorganismo (Sango, 2019).

2.3.5.1. Tipos de agentes químicos antimicrobianos.

Antisépticos: Son agentes antimicrobianos que destruyen o inhiben el crecimiento de microorganismos en tejidos vivos, suelen tener un bajo nivel de toxicidad, a manera de ejemplo encontramos el nitrato de plata, solución de yodo, alcoholes, detergentes

Desinfectantes: Son agentes antimicrobianos que por lo general se utilizan en superficies u objetos inanimados, suelen tener un alto nivel de toxicidad. Los desinfectantes químicos que se utilizan a menudo son hipoclorito

de sodio, peroximonosulfato de potasio, compuestos de amonio cuaternario y peróxido de hidrógeno, entre otros (Faisca, et al., 2021).

2.3.6. Mecanismo de acción de los agentes antimicrobianos.

La acción microbicida provoca daños bioquímicos, interferencia metabólica y acarrea a la muerte celular. Su eficacia está relacionada con la presencia de agua, ello se debe a que estos compuestos acuosos penetran mejor en las células y microorganismos permitiendo así el daño hasta provocar una lisis celular. Los agentes antimicrobianos actúan reduciendo la carga microbiana, por ejemplo, eliminando, inactivando, inhibiendo o destruyendo microorganismos patógenos. Muchas medidas de control microbiológico tienen varias funciones. Algunas medidas de estos agentes también tienen efectos microbicidas, cuya potencia depende a menudo de la intensidad con la cual se aplican a manera de ejemplo, reducción del pH, en general, las formas ionizadas de los agentes disociables pasan mejor a través de las membranas biológicas, y por lo tanto son más efectivos (Colcha, 2021).

2.3.7. Resistencia microbiana contra los desinfectantes.

La capacidad de resistencia microbiana a los antibióticos es un fenómeno ampliamente descrito. El desarrollo de resistencia microbiana a los desinfectantes es menos probable, ya que los desinfectantes son agentes biocidas más poderosos que los antibióticos y aplican en mayores concentraciones contra las poblaciones de microorganismos más bajas que, por lo general, no están en crecimiento activo; es por ello que la presión selectiva para el desarrollo de resistencia es menos profunda (Cabrera et al., 2007).

Estos organismos tienen dos mecanismos de resistencia, el primero es una resistencia intrínseca y el segundo una resistencia adquirida. En la resistencia intrínseca la célula presenta una barrera para reducir la entrada de un agente antimicrobiano. También la edad de los cultivos influye en la resistencia a la sensibilidad hacia los desinfectantes, ya que la pared celular es mucho menos sensible en fase estacionaria que en fase logarítmica (Patiño et al., 2018).

Los hongos son generalmente más resistentes que las levaduras y considerablemente más resistentes que las bacterias no esporuladas. Las

esporas de los hongos son menos resistentes que las esporas bacterianas a los agentes biocidas (Valdés, 2007).

2.3.8. Desinfectantes utilizados en la industria de levaduras.

Los procesos de desinfección mediante agentes químicos ayudan y hacen parte fundamental de los procedimientos en las industrias de alimentos para garantizar la inocuidad y seguridad alimentaria, con la finalidad de evitar enfermedades alimentarias o bien denominadas ETA's y otorgar al producto final mayor vida útil.

La acción y eficacia de los desinfectantes dependen de factores como la concentración de activo, tiempo de contacto, temperatura de aplicación, tensión superficial de la solución, pH, frecuencia de uso, tipos de microorganismo y sobre todo una limpieza y proceso exhaustiva, ya que de este paso se separa la materia orgánica e inorgánica de la superficie implicando que la aplicación del desinfectante sea de mayor capacidad de inhibición, (Pérez-Esteve, et al., 2017; Morocho-Catota, 2020).

A continuación, en la tabla 5. Se detalla el uso de algunos principios activos o agentes desinfectantes que son parte de las soluciones químicas antimicrobianas utilizadas en la industria.

Tabla 5.

Principio activo de las soluciones químicas desinfectantes y uso en la industria.

Agente o Principio activo	Uso
Alcohol (etanol 70-96 % en agua)	Desinfectante de uso general para cualquier superficie.
Sales de amonio cuaternario	Desinfectante e higienizante con uso frecuente en equipos de la industria láctea y alimentaria
Cloraminas, Hipoclorito de sodio, Clorito de sodio, Dióxido de sodio.	Desinfectante e higienizante para equipos de la industria láctea y alimentaria y depuración de agua.
Glutaraldehído (OHC(CH ₂) ₃ CHO)	Biocidas de amplio espectro, Solución al 2% como desinfectante o esterilizante.

Peróxido de hidrógeno	Vapor usado como esterilizante. Se utiliza en desinfección de envases y al iniciarse turnos de trabajo en una instalación. No deja residuos.
Ácido Peracético	Debido a su carácter no espumante, son muy utilizados en la desinfección de circuitos e instalaciones cerradas. Desinfectante de alto nivel y esterilizante.
Compuestos Fenólicos	Desinfectante de uso general para superficies. Utilizados en la higiene de manos y locales a concentraciones variables entre 1000 mg/L y 10000 mg/L. T
Aminas Terciarias	Desinfectante de amplio espectro para circuitos y superficies.

Nota: Recuperado de Pérez-Esteve, et al., (2017)., la tabla describe las moléculas activas de diferentes compuestos de desinfectantes implementados en los procesos de aseo de superficies, equipos y áreas en las industrias de manufactura.

Los desinfectantes utilizados en la empresa productora de levadura son biocida LOGOS y Procide los cuales son compuesto químico resultante de la mezcla de ácido acético y peróxido de hidrógeno, su espectro de acción es amplio sobre microorganismo Gram positivos algunos Gram negativos como *E. coli*, *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*, virus, hongos, levaduras y esporas (Aguayo, et al., 2017). La capacidad de inhibición que presentan estos dos agentes es que no se degradan en presencia de materia orgánica y entre sus cualidades sobresale su rápida acción oxidante por la conducción de electrones del ácido en forma oxidada la pared celular de bacterias, dañando su membrana externa y haciendo que detengan su actividad o induzcan su lisis y muerte (Centro Estatal de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, 2015).

2.3.8.1. Microbiocida LOGOS™ 1120PA

- **Descripción**

Es un desinfectante en una solución acuosa de amplio espectro a base de ácido peracético 5 % + Peróxido de hidrógeno 15 % + Ácido acético 5 %. Este biocida actúa en un amplio rango de pH y temperatura. LOGOS 1120PA tiene su

uso permitido en alimentos ya que su activo se encuentra dentro de los capítulos de FDA (Food & Drug Administration).

- **Aplicaciones**

Este agente químico presenta propiedades bactericidas, fungicidas y esporicidas, indicada para la prevención y eliminación de depósitos de limo y en el control de bacterias coliformes totales, anaerobias reductoras de sulfato asociadas a procesos microbiológicos de corrosión.

Tabla 6.

Información técnica del microbiocida LOGOS™ 1120PA.

Nombre químico	Concentración (% v/v)
Peróxido de hidrógeno	>= 10 - < 20
Ácido acético	>= 10 - < 20
Ácido peracético	>= 5 - < 10

Nota: Descripción de la composición química que presenta LOGOS™ 1120PA suministrada por la ficha técnica del proveedor. Se describen los nombres químicos de los componentes así como su concentración en la solución desinfectante.

- **Modo de Uso**

Aplicar con el espumador, dejar residencia de 20 minutos, no requiere enjuague. Para piezas pequeñas, sumergir las piezas a desinfectar en el balde con el desinfectante, dejar residencia de 20 minutos. No enjuagar. 2,3,8,1

2.3.8.2. Procide (Ácido peracético 18 % + peróxido de hidrógeno 12 %).

Es agente químico oxidante de olor fuerte, utilizado como desinfectante de amplio espectro que no requiere enjuague posterior y cumple con los requisitos de la norma FDA 178.1010 para su aplicación como sanitizante de equipos y utensilios que están en contacto con alimentos.

- **Descripción**

Es un desinfectante de amplio espectro a base de ácido peracético 18 % + Peróxido de hidrógeno 12 %.

Tabla 7.

Información técnica de Procide (Ácido peracético 18 % + peróxido de hidrógeno 12 %).

Apariencia	Líquido inodoro
Ácido peracético (%)	16.0 ± 2.0
Peróxido de Hidrógeno (%)	10.0 ± 2.0
pH (solución acuosa al 1 %)	3.0 ± 1.0

Nota: Descripción de la composición química y de pH de Procibe suministrada por la ficha técnica del proveedor. Se describen los nombres químicos de los componentes, su concentración y el pH de la solución desinfectante.

- **Modo de Uso**

Se dosifica según el proveedor en condiciones normales entre el 0.2 % y el 0.5 % para preparar la solución sanitizante, y se aplica entre 2 °C y 40 °C. La solución se deja actuar entre 30 y 120 minutos y luego se drena sin enjuague posterior. Este agente biocida se utiliza en la industria de frutas, carnes, cervecerías, productoras y envasadoras de gaseosas y jugos, lecherías, plantas de fermentación, vinerías, confiterías. También se usa para higienizar plantas productoras de cosméticos y productos farmacéuticos entre otros.

2.3.9. Técnicas para evaluar la eficiencia de desinfectantes en la industria de alimentos.

La evaluación de la efectividad de un desinfectante es de gran relevancia para establecer su rotación. Cabe destacar que no existen técnicas específicas que se deban utilizar para la evaluación de los desinfectantes, pero existen técnicas analíticas que nos ayudan a determinar la eficacia, entre los que se pueden mencionar los siguientes:

2.3.9.1. Coeficiente fenólico

El coeficiente fenólico, también conocido como coeficiente de desinfección, es un término utilizado en microbiología para medir la eficacia de los desinfectantes y antisépticos. El coeficiente fenólico es una medida importante para la evaluación de la eficacia de los desinfectantes y antisépticos, ya que permite comparar la efectividad de diferentes productos en la eliminación de microorganismos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el coeficiente fenólico no es una medida absoluta de la eficacia de un desinfectante o antiséptico, ya que la actividad puede variar en función de la concentración del producto, el tipo de microorganismo y las condiciones de uso (Alba & Araujo, 2008).

2.3.9.2. Difusión en agar (Técnica de KIRBY - BAUER).

Es una técnica cualitativa y sus resultados se expresan únicamente como “Sensible”, “Intermedio” o “Resistente” y es implementada con microorganismos de crecimiento como *Staphylococcus* sp. O los integrantes de la familia *Enterobacteriaceae* entre otros (Yaguapaz-Cortez, 2023).

La técnica consiste en llevar un inóculo bacteriano a una concentración de igual en la escala de McFarlane de 0,5 y se siembra masiva y homogénea por superficie de una placa seca de agar Müeller-Hinton Una vez realizado esto, en un plazo no mayor de 15 minutos, se procede a colocar los discos o las pastillas con el antibiótico o biocida a evaluar. Luego, la placa se incuba a 35 °C por 18 horas excepto para los aislamientos de *Staphylococcus* sp. y *Enterococcus* sp., para los cuales se recomienda una incubación de 24 horas. La lectura de los resultados se observa en luz indirecta y cada halo de inhibición es medido usando un calibre o en su defecto una regla graduada. En el caso de que no se presente un halo, se reportan 6 mm, ya que ese es el diámetro del disco (Romero-Veramendi & Baldeón-Mendoza, 2021).

2.3.9.3. Concentración Mínima inhibitoria (CMI)

Es la concentración más baja de un antibiótico o desinfectante que inhibe el crecimiento de un determinado grupo microbiano, en el caso de los antibióticos las concentraciones con expresadas en $\mu\text{g/mL}$ y para desinfectantes en porcentaje (%) de concentración (IDEXX, 2022).

2.4. Marco normativo.

Resolución 2674 2013, La cual dispone lo siguiente.

Requisitos higiénicos de fabricación; Artículo 16. Materia prima e insumos; Las materias primas e insumos deben ser inspeccionadas previo al uso, clasificados y sometidos a análisis de laboratorio esto, para determinar la inocuidad si cumplen o no con las especificaciones de calidad establecidas y para garantizar la calidad del producto final.

Artículo 18. Fabricación; En la fabricación se deben establecer y registrar todos los procedimientos de control físicos, químicos, Microbiológicos y organolépticos en los puntos críticos del proceso de fabricación, con el fin de prevenir o detectar cualquier contaminación, falla de saneamiento, incumplimiento de especificaciones o cualquier otro defecto de calidad e inocuidad en las materias primas o el alimento, materiales de envase y/o producto terminado

Aseguramiento y control de la calidad e inocuidad; Artículo 22. Sistema de control; Para asegurar el higiene e inocuidad del producto final es necesario contar con un sistema de control integral y aseguramiento de calidad, el cual debe ser esencialmente preventivo y cubrir todas las etapas de procesamiento del alimento, desde la obtención de la materia prima e insumos, hasta la distribución de productos terminados. Así mismo ese sistema de control y aseguramiento de calidad debe contar con planes de muestreo, los procedimientos de laboratorios, especificaciones y métodos de ensayos deben garantizar que los resultados sean confiables y representativos del lote analizado. Y este a su vez no se limita a las operaciones de laboratorio, sino que debe estar presente en todas las decisiones vinculadas con la calidad del producto.

Artículo 23. Laboratorios: Para garantizar la calidad de los alimentos que se fabrican, procesan y distribuyen, los establecimientos deben tener acceso a un laboratorio de pruebas y ensayos, propios o externos.

3. METODOLOGÍA.

3.1. Tipo de estudio y línea de investigación.

Se realizó un estudio de tipo descriptivo, evaluativo y de corte transversal, dada la descripción que se hará sobre la presencia de microorganismos indicadores en el área de fase de corte y la levadura como producto final, así mismo las concentraciones óptimas de desinfectes como biocidas.

Esta propuesta de investigación encaja en la línea de investigación Bioindicadores, la cual, hace parte del programa de Microbiología, adscrito a la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Popular del Cesar.

3.2. Universo, población (n) y localización de estudio.

Área de estudio

El estudio se ejecutó en el laboratorio de microbiología de una planta productora de levadura comercial para panificación ubicada en la ciudad de Palmira, Valle del Cauca, Colombia.

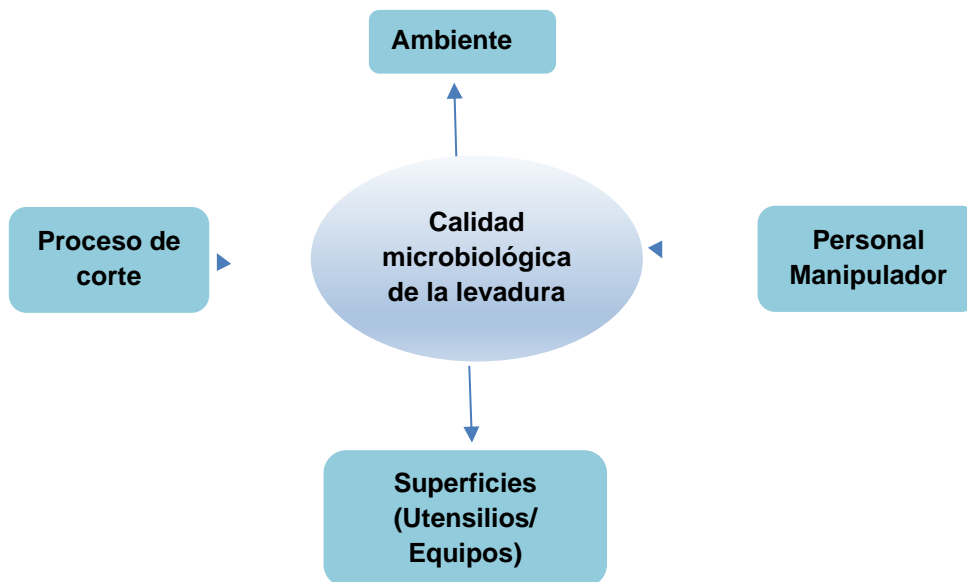
3.3. Diseño metodológico.

3.3.1. Determinar las fuentes de contaminación en fase de corte y empaque de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* por *Geotrichum candidum*.

Para el monitoreo se clasificaron cuatro posibles fuentes de contaminación microbiana en fase de corte y empaque que pueden incidir significativamente sobre la calidad del producto terminado, tal como se muestra en la Figura 1.

Figura 1.

Factores asociados a la calidad microbiológica del producto final en fase de corte y empaque.



Nota: La figura describe los elementos y superficies que representan factores importantes en la conservación de calidad final del producto en el área de corte y empaque, cada factor descrito está en contacto directo con la levadura procesada.

Las muestras se recolectaron en puntos estratégicos del área de proceso en los que se sabe que se obtiene información valiosa relativa a posibles riesgos microbiológicos, y estas presentan contacto directo con el producto final antes de su empaque en el proceso de corte, también son relativas a aspectos críticos relacionados con la calidad y deterioro de los alimentos. La cantidad y criterios de muestras representativas por cada superficie, ambiente y producto terminado se relaciona en la Tabla 8.

Procedimientos

El muestreo para determinar la fuente de contaminación se realizó en dos etapas, en la cual la primera etapa tuvo como fin brindar un diagnóstico inicial del estado microbiológico del área donde se seleccionaron superficies de acero,

plástico, inanimadas y ambientes tal como lo muestra la Tabla 8., debido a que estas se preparan antes de iniciar el proceso. La segunda etapa fue para validar los procesos de limpieza y desinfección, mediante un método visual el cual se realizó para asegurar que la superficie homologa al material del área estuviera sin residuos trazas, un método microbiológico y ATP (Unidades Relativas de Luz).

Tabla 8.

Crterios de muestreo para las superficies, ambientes y producto final , en fase corte y empaque de levadura.

Criterios de muestreo								Muestras tomadas (Semanas)												
Superficies muestreadas	Tipo de limpieza	(t) limpieza	Logos semana 1-2		Procide semana 3-4		Semana 1		Inspección visual	Semana 2		Inspección visual	Semana 3		Inspección visual	Semana 4		Inspección visual	Total	
			(t) Contacto	Concentración	(t) Contacto	Concentración			Cumple/No cumple			Cumple/No cumple			Cumple/No cumple			Cumple/No cumple		
PLASTICO	Balde 1	Profunda	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
	Balde 2	Profunda	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
	Balde 3	Profunda	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
	Balde 4	Profunda	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
	Banda transportadora	Profunda	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
ACERO	Mezcladora	Profunda	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
	Moldeadora	Profunda	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
	Bajante Mezclador	Profunda	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
	Cortadora	Profunda	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
	Superficie Injet	Profunda	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
SUPERFICIES INALAMBRADAS	Manipulador 1	Profunda	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
	Manipulador 2	Profunda	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
	Manipulador 3	Profunda	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
	Manipulador 4	Profunda	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
	Manipulador 5	Profunda	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
	Manipulador 6	Profunda	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
AMBIENTES	Ambiente A	Aspersiones	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
	Ambiente B	Aspersiones	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8
	Ambiente C	Aspersiones	2 h	10 min	1 % (v/v)	10 min	0,5 % (v/v)	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	1	1	Cumple	8

PRODUCTO TERMINADO	Muestra 1	Na	Na	Na	Na	Na	Na	3	3	Na	3	3	Na	3	3	Na	3	3	24
	Muestra 2	Na	Na	Na	Na	Na	Na	3	3	Na	3	3	Na	3	3	Na	3	3	24
	Muestra 3	Na	Na	Na	Na	Na	Na	3	3	Na	3	3	Na	3	3	Na	3	3	24
	Muestra 4	Na	Na	Na	Na	Na	Na	3	3	Na	3	3	Na	3	3	Na	3	3	24
	Muestra 5	Na	Na	Na	Na	Na	Na	3	3	Na	3	3	Na	3	3	Na	3	3	24
	Muestra 6	Na	Na	Na	Na	Na	Na	3	3	Na	3	3	Na	3	3	Na	3	3	24

Nota: Se muestran los criterios de acuerdo a los tipos de materiales implementados en el proceso de producción. Se describe las superficies, tipo de limpieza de acuerdo a los procedimientos interno, tiempo de duración de limpieza y los desinfectantes con su concentración y tiempo de contacto. También se detallan la cantidad de muestras tomadas y verificación del proceso de aseo (*cumple o no cumple*) verificada en cada toma de muestra por semana.

En cada inspección visual *Cumple** cuando no se evidencia a simple vista trazas de residuos del producto, y *No cumple** cuando quedan partes de esta en superficies. (t): tiempo*

3.3.1.1. Toma de muestras de superficies y manipulador.

Se realizaron hisopados con caldo Letheen estéril una vez por semana a superficies, utensilios, equipos y personal manipulador después de la jornada de limpieza y desinfección, esto para validar y conocer la eficiencia del proceso de aseo por un periodo de cuatro semanas, la duración del muestreo se definió para establecer la persistencia en tiempo con respecto a la contaminación de *G. candidum* y de acuerdo al cronograma establecido por la empresa. En la Tabla 8., se denotan la cantidad de muestras por superficies y manipulador.

3.3.1.1.1. Técnicas de muestreo con hisopos para superficies de contacto inertes y personal manipulador.

Aplica a todas las muestras de superficies tomadas en el área de fase de corte y empaque de levadura, la cuales fueron analizadas en el laboratorio de microbiología.

Este método se implementó para la toma de muestras de superficies inertes regulares e irregulares, tales como banda transportadora blanca, mezcladora, moldeadora, bajante de mezcladora, ojal cortadora, superficie inyector, recipientes de recirculación (baldes blancos), para el caso del personal se realizaron frotis en las palmas de las manos. Se tomó como criterio de selección para el muestreo que todas superficies inertes e inanimadas que cumplieran con el concepto de limpieza (inspección visual) en cada una de las cuatro semanas muestreadas tal como se observa en la Tabla 8.

- **Procedimiento de toma de hisopados**

Para la toma de muestra en superficie se tomó un hisopo estéril por el extremo de madera entre el dedo índice y el pulgar, se humedeció en el tubo con caldo Letheen + Tween 80 estéril presionando ligeramente en la pared del tubo para quitar el exceso de solución. En áreas y superficies húmedas no es necesario humedecer el escobillón (Carrero y Avila-Panche, 2017).

Se ubicó la punta del hisopo en la superficie o área seleccionada, ejemplo (banda transportadora blanca, mezcladoras, pisos, paredes y frotis de palmas de manos), y disponer una línea del área estimada de 20 cm² mientras se realiza

un movimiento rotativo del hisopo entre el pulgar y el dedo índice en dos direcciones en zig zag. Si se muestrean objetos o utensilios se debe tomar un número de estos que sea representativo (Caro-Hernández y Tobar, 2020).

Luego de realizar la toma de la muestra se deberá colocar el hisopo en el tubo con la solución, quebrando la parte del hisopo que estuvo en contacto con los guantes del analista, la cual debe ser eliminada. Por último se debe agitar el tubo, previamente rotulado, asegurándose que el hisopo quede inmerso en la solución diluyente y se debe verificar que el tubo esté bien cerrado, para evitar pérdida de solución. Dejar durante 15-20 minutos de manera que los microorganismos se liberen del algodón a la solución.

Tabla 9.

Recuento e identificación de hongos y levaduras en manipuladores y superficies inertes.

Área	Mohos	Levaduras
Superficies de contacto.	<p>Recuento en placa por Superficie/Profundidad.</p> <p>Lectura: Por recuento en placa.</p> <p>Identificación macroscópica y microscópica con azul de Lactofenol.</p>	<p>Recuento en placa por Superficie/profundidad.</p> <p>Lectura: Por recuento en placa.</p> <p>Identificación macroscópica y microscópica con azul de Lactofenol.</p>

Nota: Se describe el método de análisis y lectura en laboratorios para mohos y levaduras los cuales se realizan en el muestreo de superficies de contacto. Así mismo el método de identificación.

3.3.1.2. Toma de muestras para ambiente.

La toma de muestras se realizó mediante la técnica de sedimentación pasiva en placa, diariamente se muestreó el área (Figura 2.) durante el proceso de corte y empaque de la levadura esto para validar y conocer la eficiencia del

proceso de aseo e índice de calidad del aire, por un periodo de cuatro semanas. El reporte se realizó en UFC/15 min.

Figura 2.

Área de corte y empaque de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) comercial.



Nota: La figura muestra el área de corte y empaque, en la imagen (a) se puede observar el equipo ojal cortador y la banda transportadora blanca, imagen (b) la superficie Injet y la imagen (c) mezclador, bajante del mezclador y moldeadora.

3.3.1.2.1. Técnica de muestreo para ambientes por medio de sedimentación.

Para la recuperación de microorganismos del aire se hizo de acuerdo a la metodología propuesta por Romero-Bohórquez y Castañeda-Alvarado (2017); que consistió en tomar cajas de Petri de 25 mL con medio PDA y Sabouraud, las cuales fueron expuestas durante 15 minutos, y una vez transcurrido el tiempo estipulado de muestreo se incubaron a temperatura ambiente durante un periodo de 5 días.

- Expresión de Resultados.

Pasado el periodo de incubación se determinó mediante recuento en placa por superficie e identificación macroscópica y microscópica con azul de Lactofenol.

- Recuento de Mohos y levaduras.

Si el resultado marca negativo se realizaban informes provisionales durante la incubación y el resultado definitivo a los 5 días por tres semanas. Se reportaron los resultados por punto de muestreo, realizando la suma de todas las colonias encontradas en los diferentes puntos (A, B y C) verificados por m³.

3.3.1.3. Toma de muestras de producto terminado mediante la técnica de Pull.

En esta etapa se evaluó el producto final tomando 3 muestras de cada lote en fase final de producción, obteniendo 36 muestras de producto terminado, en la Tabla 8., se evidencia el total por cada una de las muestras, antes del empaclado y salida, esto con el fin de realizar el análisis microbiológico para evaluar la calidad y si presta conformidad para ser liberado y comercializado.

Procedimiento

La siembra de la muestra se realizó de acuerdo lo descrito por los procesos interno de la empresa y NTC 1807, que consistió en pesar en una bolsa estéril 300 g de las muestras en condiciones asépticas descartando un tercio de las diferentes barras de levadura, en un frasco estéril se añadieron 90 mL de

agua peptonada estéril, 10 gr de la muestra y se homogeneizó por 2 minutos. Así mismo se procedió a realizar siembras en profundidad para la detección de *G. candidum*, la cual consistió en tomar 1 mL de la muestra diluida y adiclarla en una caja Petri para posteriormente añadir aproximadamente 20 mL de medio PDA y se llevada a incubación por 48 a 72 horas a una temperatura ambiente de 28 ± 2 °C, para su posterior crecimiento y lectura.

3.3.1.4. Cálculo y expresión de resultados.

- **Para superficies regulares e irregulares**

Los resultados de toma de hisopados se expresarán en Unidades Formadoras de Colonias (UFC/25cm).

- **Para ambientes.**

El recuento en aire se expresa en UFC/15 min

- **Para productos terminados.**

- *Geotrichum candidum*:

Los resultados de las siembras se expresarán en Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Criterio de aceptación para la Levadura fresca en presentación de 500g (ver en Tabla 2).

Tabla 10.

Criterio de aceptación para la fase corte y empaque de la levadura fresca.

Parámetros	Método	Especificación	Norma
Mohos UFC/gr	Recuento en Placa	Ausente	Na*
<i>Geotrichum candidum</i> UFC/gr	Recuento en Placa	Ausente	Na*

Nota: Parámetros microbiológicos de referencia en la industria de producción de levadura para panificación para el área de corte y empaque (Datos interno de la empresa no publicados). Na* (No aplica).

Tabla 11.

Criterio de aceptación para manipulador en planta de producción de levaduras comerciales.

Parámetros	Método	Especificación	Norma
Coliformes totales	Hisopados y Caldo LMX	Ausente	NTC 4516
<i>E. coli</i>	Hisopados y Caldo LMX	Ausente	NTC 4516
Mohos	Hisopados y Recuento en placa	Ausente	NTC 4516

Nota: Especificaciones microbiológicas aceptables para el personal manipulador perteneciente a la fase de corte y empaque en la producción a escala industrial de *S. cerevisiae* de acuerdo a la Norma Técnica Colombiana (NTC) 4516 establecidas en las plantas de producción. Y métodos de detección en laboratorios.

3.3.2. Evaluar *in vitro* la concentración y tiempo de contacto de dos desinfectantes comerciales empleados en el proceso de corte y empaque, sobre la tasa de inhibición de *G. candidum*.

Para evaluar la eficiencia de los diferentes agentes desinfectantes Biocida Logos y Procide (Tabla 12) contra *Geotrichum candidum* a nivel *in vitro* e *in situ*; las pruebas se realizaron en el Laboratorio de Microbiología y en el área de corte de la empresa fabricante de Levadura *Saccharomyces cerevisiae* ubicada en Palmira, Valle del Cauca.

Tabla 12.

Concentraciones de agentes químicos desinfectantes utilizados en los procesos de limpieza y desinfección contra G. candidum.

Desinfectantes	Molécula activa	Dosis ml*L ⁻¹			Tiempo de contacto con el desinfectante
		Mínima	Recomendada	Máxima	Minutos
Microbiocida LOGOS™ 1120PA	Es un desinfectante de amplio espectro a base de ácido peracético 5 % + Peróxido de hidrógeno 15 % + Ácido acético 5 %.	0,5 %	1 %	1,5 %	10 min
					15 min
					20 min
Procide (Ácido peracético estabilizado)	Es un desinfectante de amplio espectro a base de ácido peracético 18 % + Peróxido de hidrógeno 12 %.	0,5 %	1 %	1,5 %	10 min
					15 min
					20 min

Nota: Descripción del ensayo para en el que se evaluó a nivel *in vitro* los agentes desinfectantes químicos utilizados en el proceso de eliminación de *G. candidum*, detallando las moléculas activas de cada biocida, las dosis que se implementaron y los tiempos de contacto.

Las soluciones desinfectantes se prepararon en agua destilada estéril, en las dosis recomendadas por sus respectivas fichas técnicas (Tabla 11). Para realizar las pruebas *in vitro* se preparan 100 mL de cada producto a las diferentes concentraciones antes del ensayo, lo anterior con el propósito evaluar estos agentes y su capacidad contra el moho *G. candidum*.

3.3.2.1. Preparación de Inóculo.

Consistió en tomar el aislamiento de *G. candidum* identificado mediante un examen microscópico realizado por el laboratorio SYNLAB (ver Anexo 6), y recuperado en agar PDA como contaminante de productos de levadura en fase corte y empaque, para utilizarlo en la prueba *in vitro*. Para la preparación del inóculo se tomó un cultivo fresco de *G. candidum* en cajas de Petri con agar PDA (Agar Papa Dextrosa) en el cual con un asa micológica estéril se hizo un raspado de las colonias, se añadieron en un Erlenmeyer de 250 mL con 90 mL de caldo extracto de malta al 2 % estéril, para posteriormente optimizar a una concentración de 1×10^6 conidios/ml mediante cámara de Neubauer.

3.3.2.2. Evaluación del efecto de desinfectante frente al crecimiento de *G. candidum*. Dilución en tubo.

Se realizaron diferentes diluciones de los dos agentes biocidas desinfectantes a las concentraciones antes mencionadas (Tabla 12). Se les añadieron a tubos de 15 mL con 8 mL de caldo de extracto de malta al 2 % estériles 1 mL de cada dilución de desinfectantes, así mismo se le añadió la misma cantidad de una suspensión del microorganismo como se mencionó en el ítem 2.1.1. La evaluación del efecto del desinfectante contra el crecimiento del moho se realizó por medio de las siguientes técnicas:

- **Recuento en placa.**

Se realizó una suspensión en tubos con 8 mL de extracto de malta en el cual se le adicionó 1 mL con la cepa de *G. candidum* a una concentración de 10^6 conidias/mL, optimizado como se mencionó anteriormente y 1 mL de las soluciones desinfectantes. Cada tratamiento de cepa + desinfectante se evaluó por determinados intervalos de tiempo (minutos) de 10, 15 y 20 min a diferentes concentraciones, tal como se describe en la Tabla 13 y 14. A partir de la suspensión inicial de 10 mL se añadió 1 mL en cajas de Petri usando una micropipeta con puntas estériles para posteriormente servir una cantidad de 15 a 20 mL de Agar PDA con ácido tartárico 2,8 % y cycloheximide 1 %, manteniendo la temperatura del medio a no más de 45 °C y se llevó a incubar a 28 °C 48 horas. El ensayo consistió de 3 repeticiones por tratamiento con cepa *G. candidum*, *G. candidum* + dosis de desinfectante + intervalo de tiempo y un control negativo sin inocular (agua destilada estéril). Vandevenne y Ribes, (2002), García Saucedo, S. M. (2013).

Tabla 13.

Tratamientos para evaluar por método de recuento en placa el desinfectante Microbiocida LOGOS™ 1120PA contra G. candidum a diferentes tiempos y concentraciones.

Tratamientos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Agua destilada estéril	■									
Microbiocida LOGOS™ 1120PA + G. candidum		■	■	■	■	■	■	■	■	■
10 min		■	□	□	■	□	□	■	□	□
15 min		□	■	□	□	■	□	□	■	□
20 min		□	□	■	□	□	■	□	□	■
0,50 %		■	■	■	□	□	□	□	□	□
1 %		□	□	□	■	■	■	□	□	□
1,50 %		□	□	□	□	□	□	■	■	■

Nota: Diseño experimental de tratamiento a evaluar LOGOS™ 1120PA contra G. candidum a tiempos de 10, 15 y 20 min y concentraciones de 0,5%, 1% y 1,5%, con un primer tratamiento como control negativo de agua destilada estéril.

Tabla 14.

Tratamientos para evaluar por método de recuento en placa el desinfectante Procide contra G. candidum a diferentes tiempos y concentraciones.

Tratamientos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Agua destilada estéril	■									
Procide (Ácido peracético estabilizado)		■	■	■	■	■	■	■	■	■
10 min		■	□	□	■	□	□	■	□	□
15 min		□	■	□	□	■	□	□	■	□
20 min		□	□	■	□	□	■	□	□	■
0,5 %		■	■	■	□	□	□	□	□	□
1 %		□	□	□	■	■	■	□	□	□
1,50 %		□	□	□	□	□	□	■	■	■

Nota: Diseño experimental de tratamiento a evaluar Procide contra G. candidum a tiempos de 10, 15 y 20min y concentraciones de 0,5 %, 1 % y 1,5 %, con un primer tratamiento como control negativo de agua destilada estéril.

Interpretación de resultados

El recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras (RTCHL) se considera equivalente al número de UFC encontrado empleando Agar PDA; si se detectan colonias de bacterias en este medio, contarlas como parte del RTCHL. Cuando se indica un criterio de aceptación para la calidad microbiológica, éste se interpreta de la siguiente manera:

- 10^1 UFC: recuento máximo aceptable = 20
- 10^2 UFC: recuento máximo aceptable = 200
- 10^3 UFC: recuento máximo aceptable = 2000.

3.3.3. Validar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para dos desinfectantes empleados en el proceso de desinfección en el área de corte y empaque de levadura.

Para la validación del CMI de los dos desinfectantes, se realizó a nivel *in situ* de acuerdo a los resultados del ensayo anterior (ítem 6.3.2.2), donde se seleccionó la concentración y el tiempo que mejor demostraron resultados para la eliminación de *G. candidum*. La optimización de la cepa contaminante se realizó de acuerdo a lo descrito en el ítem 6.3.2.1 a una concentración de 1×10^6 conidios/mL, obteniendo una suspensión stock en caldo extracto de malta.

El procedimiento se realizó de acuerdo a la prueba 1116 de la USP 40 (United States Pharmacopeial 40, 2017); se tomó una superficie análoga al material donde se aplicará el desinfectante en el área de corte y empaque de la levadura, en la cual se tomaron muestras por hisopado antes del ensayo con caldo Lethen con Tween 80, posteriormente a esto se esparció 1 mL de microorganismo sobre una superficie de 25 cm x 25 cm, así mismo se realizó un muestreo por hisopado para recuperar el número de conidios sin exponer, después se aplicó el agente biocida a la concentración y tiempo obtenidos de los resultados del ítem 6.3.2.2., de igual manera se muestreó para recuperar el número de conidios luego de la exposición. Después de recolectar las muestras se tomó 1 mL de cada tubo con el hisopo y se sembró por profundidad en cajas de petri añadiendo agar PDA e incubando a temperatura ambiente por 48 horas.

Se realizaron los cálculos de: Reducción logarítmica empleando la fórmula.

$$\text{Red Log} = \text{Log } [N_0] - \text{Log } [N]$$

donde:

N_0 : número de microorganismos recuperadas sin exponer

N : número de microorganismo recuperadas luego de la exposición.

- **Visualización microscópica y macroscópica.**

Transcurridas las 48 horas de las siembras por recuento en placa, se colocó una asada del cultivo fúngico y una gota de azul de Lactofenol, entre lámina y laminilla, para la descripción morfológica y registro fotográfico.

3.3.3. Tratamiento de datos.

Para este ensayo se implementó un diseño experimental factorial de dos factores y tres niveles, siendo el factor 1 concentración y el factor 2 tiempo, con tres repeticiones para cada tratamiento (desinfectante) y el control negativo sin este.

A partir de los registros del crecimiento en cada unidad experimental obtenido a los cinco días se hizo un análisis de varianza para, posteriormente, hacer una comparación de medias de cada unidad experimental mediante la prueba de diferencia mínima significativa ($p \leq 0,05$) utilizando el paquete estadístico Minitab. Los resultados se presentaron en valores absolutos, en porcentajes, promedios, tablas y gráficos mediante una hoja de cálculo en Microsoft® Excel 2019.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Fuente de contaminación en fase de corte y empaque de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* por *Geotrichum candidum*.

La evaluación microbiológica constituye un procedimiento de control destinado a asegurar que se respeten las normas de calidad del producto. Este proceso abarca la valoración de aspectos microbiológicos relacionados con los entornos, las superficies de contacto, los utensilios y el personal involucrado en la elaboración de alimentos (Franco et al., 2016). Así mismo, es necesario llevar a cabo una revisión microbiológica del producto terminado (Cruzado & Gallardo, 2019). De acuerdo a lo anterior los resultados obtenidos en este trabajo las muestras fueron tomadas en los cuatro puntos estratégicos de monitoreo (Ambiente, Personal manipulador, Superficies utensilios/equipos y producto terminado) para determinar la fuente de contaminación por *G. candidum* se evidenciaron como lo muestra la Tabla 15.

Tabla 15.

Resultados de las muestras tomadas en los cuatro puntos estratégicos de monitoreo (Ambiente, Personal manipulador, Superficies utensilios/equipos y producto terminado) en el área de corte y empaque de la levadura Saccharomyces cerevisiae.

Área	Semanas	1	2	3	4
Equipos	Mezclador	3 UFC/15min <i>G. candidum</i>	2 UFC/15min <i>G. candidum</i>	Ausencia	Ausencia
	Ojal cortador	Ausencia	Ausencia	Ausencia	1 UFC/15min <i>G. candidum</i>
	Moldeador	Ausencia	2 UFC/15min <i>G. candidum</i>	Ausencia	Ausencia
Utensilios	Balde 2	7 UFC/15min <i>G. candidum</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Superficies	Banda transportadora blanca	Ausencia	Ausencia	1 UFC/15min <i>G. candidum</i>	Ausencia
	Bajante mezclador	Ausencia	Ausencia	1 UFC/15min <i>G. candidum</i>	Ausencia

Personal manipulador	Manipulador 4	Coliformes totales	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Ambiente	Ambiente A (Mezclador)	2 UFC/15min <i>G. candidum</i>	3 UFC/15min <i>Penicillium</i> sp.	3 UFC/15min <i>Penicillium</i> sp.	3 UFC/15min <i>Penicillium</i> sp., 2 UFC/15min <i>G. candidum</i>
	Ambiente B (Injet)	3 UFC/15min <i>G. candidum</i>	2 UFC/15min <i>G. candidum</i> ., 2 UFC/15min <i>Penicillium</i> sp.	Ausencia	1 UFC/15min <i>Aspergillus</i> sp.
	Ambiente C (Tanque oleína)	Ausencia	1 UFC/15min <i>Aspergillus</i> sp., 1 UFC/15min <i>Penicillium</i> sp	4 UFC/15min <i>Penicillium</i> sp., 1 UFC/15min <i>G. candidum</i>	2 UFC/15min <i>Aspergillus</i> sp.
Producto terminado	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Nota: Se detallan los microorganismos aislados y caracterizados de acuerdo a su morfología macroscópicas y microscópicas, se encontró en las diferentes superficies muestreadas mohos como *G. candidum*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., y Coliformes totales el cual este último grupo se identificó mediante caldo LMX modificado según MANAFI y OSSMER.

4.1.1. Resultados de toma de muestras de superficies.

Los resultados de la carga microbiana y presencia de microorganismo contaminantes presentes en las superficies fueron las siguientes:

En cuanto a los equipos muestreados, se determinó que los factores que incidieron en la contaminación estuvieron relacionados al ambiente y superficies utensilios/equipos, en la primera semana se encontró *G. candidum* en la superficie del mezclador 3 UFC/20cm³ y Levaduras salvajes en el moldeador 25 UFC/20cm³. Además, en los utensilios, el balde #2 presentó 7 UFC/20cm³ de *G. candidum*, y en el bajante del mezclador, se detectaron 120 UFC/20cm³ de Levaduras salvajes. En la segunda semana de muestreo, como se muestra en la tabla 15, se detectó *G. candidum* en el mezclador con 2 UFC/20cm³, en el balde #3 con 3 UFC/20cm³, y en el bajante del mezclador con 16 UFC/20cm³, las características microscópicas y macroscópicas se pueden observar en el (Anexo 4, a y b), de acuerdo a Wells, J.M (1977), Atlas of Clinica Fungi (2023) y Ruiz (2022).

En la tercera y cuarta semana, solo se evidenció la presencia de *G. candidum* en la banda transportadora blanca, el bajante del mezclador y el ojal cortador, disminuyendo a 1 UFC/20cm³, la identificación de esta especie fúngica se realizó de acuerdo a las características típicas como lo menciona Wells, J.M (1977), Ruiz (2022) y Atlas of Clinica Fungi (2023).

En los resultados encontrados para el personal manipulador, no se evidenció la presencia de *G. candidum* en las semanas seleccionadas para el muestreo. Sin embargo, es importante destacar que en la semana 3, el manipulador 4 resultó positivo en la prueba de coliformes totales. León., et al., (2023) atribuye la presencia de coliformes totales como indicador de inseguridad alimentaria que está influenciada por diversos aspectos, tales como la calidad de las materias primas y las técnicas utilizadas en su preparación, manejo, almacenamiento y distribución.

A pesar que en esta investigación no se describe la identificación y evaluación de bacterias coliformes, y solo está enfocada en un solo grupo microbiano es importante destacar este hallazgo, puesto que es un indicador higiénico sanitario en las labores de producción de alimentos (Gutiérrez Velasco & Da Silva, 2020). Estos microorganismos tienen la capacidad de propagarse tanto de manera directa como indirecta como lo mencionan Guano & Chango, (2019) y Carrillo, (2013) mencionan que cuando los manipuladores entran en contacto con objetos ajenos, como basura u otros elementos, antes de manipular alimentos pueden contaminar el proceso.

4.1.2. Resultados de toma de muestras para ambiente.

El screening primario para caracterizar la calidad del aire se llevó a cabo mediante la clasificación del área de corte y empaque según la carga microbiana en unidades formadoras de colonias (UFC), detectadas durante el muestreo por sedimentación pasiva en placas durante 15 minutos. Se realizó un recuento de los microorganismos presentes en las muestras recolectadas, y los resultados se presentan a continuación.

En la primera semana, se encontraron 2 UFC/15 min en el ambiente A (Mezclador) y 3 UFC/15 min en el ambiente B (superficie Inyet). Todas las colonias encontradas se identificaron como pertenecientes al género *G. candidum*, de acuerdo a las características típicas observadas (ver Anexo 4. a), Hoogs y Guarro (2019), caracteriza en su estudio esta especie con hifas hialinas tabicadas gruesas que se fragmentan para formar artroconidios y crece de forma rápida, 48-72 horas, evidenciándose con colonias secas, harinosas, membranosas, de color blanco a crema, tal como se describe en los aislamientos de este estudio (Figura 3). Bonifaz-Trujillo, (2010) *Micología médica básica*. 4a ed, describe *G. candidum* con artroconidios, hialinos, rectangulares. Wu et al., (2023), menciona que a diferencia de otras levaduras *G. candidum* ha evaluado en comparación con otros generos fungicos con respecto a su morfología, de acuerdo al medio de crecimiento y el tiempo incubación, el cual puede producir artrosporas (tipo levadura) en una variedad de medios de crecimiento y mediante la fragmentación simultánea del micelio (tipo moho).

La identificación microscópica y macroscópica que se realizó en este estudio tal como se muestra en el Figura 3 (a y b), se evidencian las características de hifas hialinas tabicadas gruesas fragmentadas y artroconidios, todas las muestras recolectadas en la primera etapa de este estudio que cumplieron con las características antes mencionadas se clasificaron como *Geotrichum candidum*. En contraste, el ambiente C (Tanque de oleína) no mostró crecimiento de mohos. En todos los puntos de muestreo durante la semana 1, no se observó crecimiento de levaduras en las cajas expuestas en el área de corte y empaque.

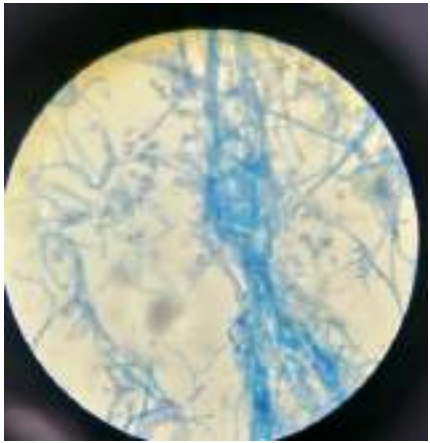


En la segunda semana de muestreo, el ambiente A presentó 3 UFC/15 minutos, el ambiente B 4 UFC/15 min, y todas las colonias se identificaron como pertenecientes al género *Penicillium* sp., según el estudio realizado por Pitt JI. (1979), el cual describe conidias y estructuras ramificadas en forma de pincel y su crecimiento macroscópico en cuanto a la textura puede ser plana, filamentosa, aterciopelada o algodonosas de color azul verdoso con crecimiento rápido, la descripción de los aislados este estudio se mencionan en el Anexo 4. Por otro lado, el ambiente C registró 2 UFC/15 min, y las colonias se identificaron como pertenecientes a los géneros *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp., según sus

características microscópicas y macroscópicas. Los hallazgos anteriores se relacionan de acuerdo a lo que plantea Dinev (2011), el efecto de las corrientes de aire en la contaminación de los equipos, es relevante debido a la capacidad de hongos como del género *Aspergillus* sp., para dispersarse a través del aire y contaminar las superficies, y el entorno de los equipos utilizados en el proceso. El atlas fúngico de Insst, (2023), se utilizó como guía para identificar el género *Aspergillus* sp., hifas filamentosas y septadas con formación de ascosporas en el interior de ascas o con formación de conidios de crecimiento, textura algodonosa de color de verde-amarillento (*A. flavus*), blanco amarillento que cambia a negro (*A. niger*), marrón (*A. terreus*). La coloración aparece casi siempre en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales.

En la tercera semana, los análisis de calidad del aire en el ambiente A evidenciaron un crecimiento de 5 UFC/15 min de *Penicillium* sp. En el ambiente C, se registraron 2 UFC/15 min de *Penicillium* sp. y 3 UFC/15 min de *G. candidum*. En la cuarta semana de muestreo, se observó un crecimiento de 3 UFC/15 min de *Penicillium* sp. en el ambiente A, al igual que en el ambiente C, que registró 2 UFC/15 min. En el ambiente B, se encontraron 2 UFC/15 min de *G. candidum*. En el anexo 4 se detallan los hallazgos y la identificación macroscópica y microscópica de los microorganismos encontrados.

Figura 3.

Visualización microscópica y macroscópica del crecimiento de Geotrichum candidum en agar PDA aislado en fase de corte y empaque de levadura.

		
<p>a. Células levaduriforme e hifas hialinas tabicadas gruesas fragmentadas y arthroconidios. Atlas of Clinica Fungi (2023).</p>	<p>b. Bonifaz-Trujillo, (2010) <i>Micología médica básica</i>. 4a ed, describe <i>G. candidum</i> con arthroconidios, hialinos, rectangulares.</p>	<p>c. Las colonias de color blanco, vellosas, secas, con crecimiento abundante a las 48 horas, Ruiz (2022).</p>

Nota: Imágenes de los aislamientos caracterizados como *G. candidum* en el área de corte y empaque de levadura, a las 48 horas de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.
Imágenes tomadas por: Jenifer Mendoza.

4.1.3. Toma de muestras de producto terminado mediante la técnica de Pull.

Los análisis de siembra realizados para 144 muestras recolectadas en el periodo de reconocimiento e identificación de contaminantes en el área de corte y empaque, se encontró que las barras de levaduras en presentación de 500 gr no presentaron crecimiento de *G. candidum* ni otros contaminantes. Reportando la ausencia de estos en el producto terminado.

En la primera etapa experimental donde se evaluaron las cuatro fuentes de contaminación microbiana, en fase de corte y empaque se encontró *G. candidum*, *solamente* en la superficie de equipos y utensilios y ambiente, en el

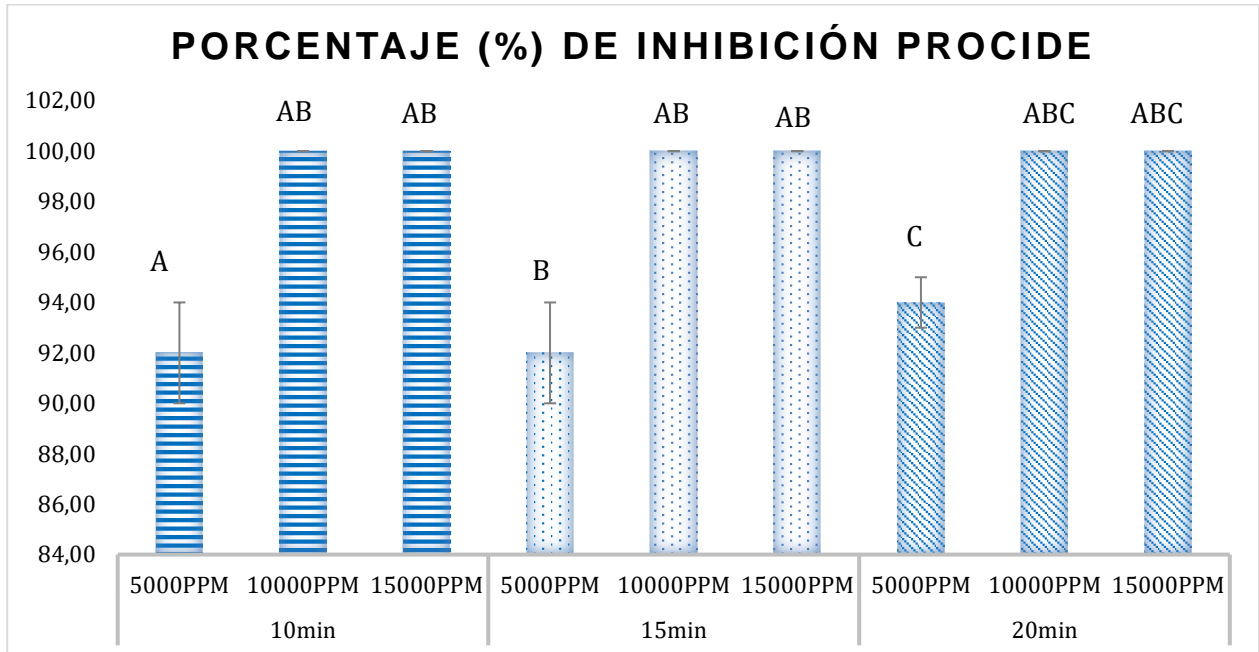
Anexo 1. se detallan los resultados de cada muestro realizado durante 4 semanas. En cuanto a las superficies y equipos que mayor carga se encontró fue en el Balde #2 con 7 UFC/20cm³, y para ambientes el punto de muestreo B (Injet) que presentó una carga fúngica de 3 UFC/15 min. De acuerdo a los resultados se denota la presencia de una especie intrusa fuera de los parámetros permisibles en dicha área, debido a que el producto se encuentra en su última fase en cuanto a su proceso de elaboración para su comercialización, esto determina una etapa crítica para la inocuidad del producto final. Estos hallazgos señalan una falencia en inocuidad y prácticas BPM en el área de corte y empaque de la levadura.

En relación a las prácticas de higiene y manipulación de alimentos, se observó que la mayoría de los manipuladores mostraban deficiencias en estas áreas. Este fenómeno posiblemente esté vinculado al tiempo que pasan en sus labores, ya que la mejora en las prácticas parece estar influida por la duración de su empleo. Además, la necesidad de mantener sus trabajos los impulsa a adoptar prácticas más adecuadas en cuanto a la higiene y la manipulación de alimentos. Estos resultados contrastan con los hallazgos de Martínez et al., (2015), quienes informaron que el 92.8 % de los participantes presentaban prácticas adecuadas, y son similares a los resultados de Firdaus et al., (2015), que indicaron que el 79 % de sus participantes llevaban a cabo prácticas adecuadas en cuanto a la manipulación de alimentos, cumpliendo de manera adecuada los aspectos de higiene, como la limpieza de su área de trabajo y el uso de indumentaria y protección apropiada.

4.2. Evaluación *in vitro* de la concentración y tiempo de contacto de dos desinfectantes comerciales empleados en el proceso de corte y empaque, sobre la tasa de inhibición de *G. candidum*.

Gráfica 1.

Resultados del porcentaje (%) de inhibición de Procide contra *G. candidum*.



Nota: Efecto de inhibición de Procide (Ácido peracético 18 % + peróxido de hidrógeno 12 %) a los minutos (10, 15 y 20). Las concentraciones expresadas en 5000PPM = 0,5 % (v/v), 10000PPM = 1 % (v/v) y 15000PPM = 1,5 % (v/v). Letras distintas indican diferencias significativas estadísticamente ($p < 0,05$).

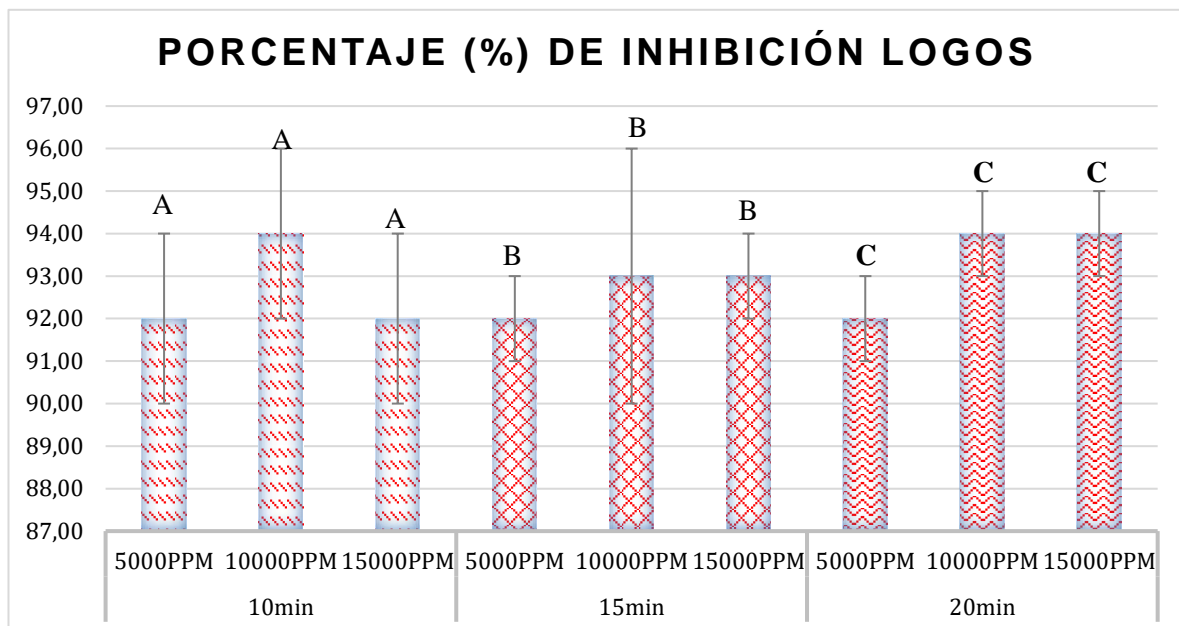
Los resultados obtenidos respecto a la reducción de la carga de *G. candidum* y para cada concentración y tiempo de exposición están expresados en la figura 1., y porcentaje de inhibición. La evaluación del efecto biocida con el desinfectante Procide (Ácido peracético 18 % + Peróxido de hidrógeno 12 %), mostró una eficacia del 100 % para las concentraciones utilizadas (1 % y 1,5 %) y a los tiempos (10, 15 y 20 min). El efecto contrario se evidenció para la concentración de 0,5 % en los determinados intervalos de tiempo, donde se observó para el tratamiento de 0,5 % a 10 min y 15 un porcentaje de inhibición promedio de 92 % y a los 20 min un promedio de 94 %. Los resultados demuestran que la efectividad biocida en *G. candidum* del Procide en cuanto a los intervalos de tiempos evaluados (10, 15 y 20 min), no influyen en cuanto al

porcentaje de inhibición, no existen diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$).

El efecto de la concentración contra *G. candidum* en los tratamientos evaluados, mostraron que el biocida a concentraciones de 0,5 % (5000 PPM), 1,0 % (10000 PPM) y 1,5 % (15000 PPM) evaluadas se evidencian diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos con respecto al control, debido a que existe una variación crítica, dado en la concentración del desinfectante de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) con un 95 % de confiabilidad, (ver en Anexo 1). Así mismo no existe interacción entre las variables (tiempo y concentración), es decir que no influye sobre el porcentaje de inhibición sin diferencia estadísticamente significativas ($P < 0.05$). El efecto de la inhibición tiene un impacto significativo con un $R^2 = 93,24$ %. Da Silva et al., (2020) mencionan que se ha encontrado que el ácido peracético tiene un alto espectro de eficiencia contra los microorganismos dañando la permeabilidad de la membrana y pared celular hecho que se sustenta en los resultados obtenidos en este ensayo donde el desinfectante Procide da un porcentaje de inhibición total a una concentración de 1 % y 1,5 % contra *G. Candidum*.

Gráfica 2.

Resultados del porcentaje (%) de inhibición de Procibe contra *G. candidum*.



Nota: Efecto de inhibición de Logos (Ácido peracético 5 % + peróxido de hidrógeno 15 % + ácido acético 5 %) a los minutos (10, 15 y 20). Las concentraciones expresadas en 5000PPM = 0,5 % (v/v), 10000PPM = 1 % (v/v) y 15000PPM = 1,5 % (v/v). Letras distintas indican diferencias significativas estadísticamente ($p < 0,05$).

En cuanto al desinfectante Logos (Ácido peracético 5 % + Peróxido de hidrógeno 15 % + Ácido acético 5 %), en la gráfica 2 muestra los resultados con respecto a la actividad biocida contra *G. candidum* se encontró que no hubo un efecto inhibitor del 100 %, pero sí de un 94 % de inhibición. Las concentraciones que presentaron un 94 % de inhibición fueron de 1 % a 10 min de exposición y 1,5 % a 20 min, los demás tratamientos presentaron un promedio de inhibiciones inferiores al 93 %. En este ensayo ninguno de los tratamientos empleados presentó resultados que garantizaran el control del agente contaminante. De acuerdo el análisis de varianza ANOVA (Anexo 2.), no existe ninguna diferencia significativa estadísticamente ($P > 0,05$), en cuanto a las variables evaluadas tiempo y concentración y su interacción, dando un porcentaje de inhibición negativo. El efecto de la inhibición presenta un impacto no tan significativo con un $R^2 = 38$ %. Ukuku (2004), puso de manifiesto que el tratamiento de melones previamente contaminados con *Salmonella* sp., utilizando una solución de peróxido de hidrógeno al 5 % durante 2 minutos resultaba en una disminución logarítmica de 3 en la carga bacteriana. Los estudios de Sapers (2001), indicaron que soluciones de peróxido de hidrógeno al 1 % lograban reducir la población de *E. coli* en la superficie de manzanas inoculadas de manera igual o incluso superior a la eficacia de 200 PPM de hipoclorito, logrando una reducción logarítmica de hasta 3 Log. A diferencia de los resultados obtenidos en este ensayo, la presencia de peróxido de hidrogeno al 15 % en Logos no demostró ser eficaz en cuanto al porcentaje de inhibición de contra *G. candidum*.

4.3. Validación In situ de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para dos desinfectantes empleados en el proceso de desinfección en el área de corte y empaque de levadura.

Tabla 16.

Resultados de validación in-situ de eficacia con Procide (ácido peracético 18 % + peróxido de hidrógeno 12 %) al 1 % (v/v) en un intervalo de 15 min de exposición.

Ensayos en superficie con:	tiempo	Concentración	Resultados UFC/mL		Reducción Log ensayo 1	Reducción Log ensayo 2	
			Ensayo 1	Ensayo 2			
G. candidum recuperado	Inmediato	Na*	r1	7100000 UFC/mL	Total	Total	
			r2	6000000 UFC/mL			
G. candidum recuperado expuestas	15 min	1 % (v/v) Procide	r1	<1 UFC/mL			
			r2	<1 UFC/mL			
Control cepa G. candidum	Na*	44000000 UFC/mL		3300000 UFC/mL	3300000 UFC/mL	Na*	Na*

Nota: Esta tabla muestra los resultados de los dos ensayos de Reducción Log de *G. candidum* evaluados en condiciones homólogas al área de corte y empaque, se detallan los resultados expresados en UFC/mL. Na*(No aplica).

Para el ensayo *in situ* se tomó el CMI de Procide a una concentración del 1 % a 15 min, esto de acuerdo a lo reportado por Rodríguez, (2015)., donde describe los criterios para seleccionar un desinfectante que consta de su capacidad para penetrar en la célula y baja toxicidad para que no genere resistencia microbiana, así mismo, López et al., (2017), evaluaron la acción germicida *in vitro* de productos desinfectantes utilizados en la industria alimentaria. Ellos demuestran que con una concentración de 2000 ppm de ácido peracético y con un inóculo de 10^7 UFC/mL de *Escherichia coli*, tuvo una disminución del 99.9 % a los 5 min de exposición. Según el test de Chamber utilizado para evaluar lo anterior, considera como un buen desinfectante al producto que, a la concentración recomendada, cause un 99.99 % de muerte a una cantidad entre 7.5×10^7 y 1.3×10^8 células/mL en 30 segundos. Comparado

con nuestros resultados, el desinfectante Procide, con un inóculo de 44.000.000 UFC/mL, arrojó una eficacia del 100 % después de 15 min de exposición.

Por lo anterior, los resultados en la fase *in situ* que se muestra en la tabla 8., se evidencia la recuperación de *G. candidum* en superficie, para esto se realizaron dos ensayos por duplicado, en el que se calculó la Reducción Log. El muestreo en la superficie con *G. candidum* sin exponer al desinfectante, para el ensayo 1; se recuperaron en promedio 3,850,000 UFC/mL, y para el ensayo 2 un promedio de 5,560,000 UFC/mL, con un inóculo inicial de 4400000. En cuanto al muestreo realizado en superficies expuesta con *G. candidum* y posteriormente desinfectada con Procide al 1 % por 15 min, se evidenció un crecimiento de <1 UFC/mL para los dos ensayos. Los cálculos de Reducción Log., muestran una reducción total de la carga microbiana de *G. candidum*, en la superficie evaluada. Para Cardoza & Torres, (2021)., mediante la técnica de recuento de placa encontraron que el Ácido Peracético al 1,2 % es efectivo a los 10 y 15 min de tiempo de contacto y a una concentración de 1,8 % es efectivo a los 5, 10 y 15 min de tiempo de contacto, similar a los resultados obtenidos en este ensayo.

4.3.1. Evaluación por Luminometría URL* (Unidades Relativas de Luz) *in situ*.

Tabla 17.

Resultados de la evaluación por Luminometría del CMI de Procide a una concentración del 1 % a 15 min contra *G. candidum*.

Ensayos	tiempo medición	Concentración		resultados /URL		Cumple /No Cumple
		<i>G. candidum</i>	Procide	r1	r2	
Superficie sin exponer	Inmediato	Na*	Na*	r1	100 URL*	Cumple
				r2	44 URL	Cumple
Superficie + <i>G. candidum</i>	Inmediato	44000000 UFC/mL	Na*	r1	23046 URL	No cumple
				r2	12026 URL	No cumple
Superficie + <i>G. candidum</i> + Procide	15 min	44000000 UFC/mL	1 % (v/v)	r1	58 URL	Cumple
				r2	56 URL	Cumple

Nota: La tabla muestra los valores en Luminometría URL* (Unidades Relativas de Luz) de Procide (Ácido peracético 18 % + Peróxido de hidrógeno 12 %) al 1 % (v/v) en un intervalo de 15 min de exposición, en superficie inerte. Criterio de evaluación (Cumple/No cumple), con valores aceptables de (<200 URL).

Se evidenció de acuerdo a la tabla 17., la eficiencia del biocida Procide, en donde los resultados muestran que mediante un método rápido para validación de limpieza y desinfección por Luminometría implementado como herramienta en plantas industriales de alimentos, que, en el ensayo realizado, al aplicar el Procide al 1 % por 15 min, redujo la carga a valores aceptables. Se observa que para la superficie sin proceso de desinfección los valores en promedio son de 17,536 URL, en contraste con la superficie desinfectada con tiempo de contacto de 15 min presentó valores por debajo de lo aceptable de 57 URL.

5. CONCLUSIONES

Dado el impacto adverso causado por la contaminación con *Geotrichum candidum* en la industria de producción de levadura fresca para panificación, se amerita una mayor investigación para combatir el crecimiento en el ambiente y también porque esta especie intrusa es emergente en los escenarios de producción de levaduras.

El estudio demostró alta presencia de microorganismos fúngicos especialmente mohos en toda el área de corte y empaque de levadura *Saccharomyces cerevisiae* fresca. Se identificó un total de 3 géneros de mohos en el área de corte y empaque de la levadura, clasificados como patógenos, estos fueron los siguientes: *Geotrichum candidum*, *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp.

El crecimiento de *G. candidum* se redujó con el desinfectante Procide en las diferentes concentraciones, a diferencia del microbiocida Logos que no logró una inhibición significativa en ningunos de los tratamiento evaluados. El desinfectante Procide demostró ser eficiente para el control del hongo contaminante, siendo mayor el efecto cuando se utilizan altas concentraciones (1,5 %), al igual se pudo constatar que el uso de los mismos agentes químicos puede tenerse en cuenta como medida de control de contaminaciones fúngicas, no obstante, la concentración sugerida (1 %) fue suficiente y aportó un beneficio significativo al proceso de desinfección para mantener la inocuidad del producto final.

En las condiciones del ensayo los hallazgos indican que el uso de desinfectantes, en particular Procide, puede ser una estrategia eficaz para controlar la contaminación fúngica en la producción de levadura, garantizando así la calidad y la inocuidad de los productos finales, y así mismo la eficacia del Procibe se debió a su naturaleza y concentración química.

En este ensayo ninguno de los tratamientos evaluados con el desinfectante logos presentó resultados que garantizaran el control del agente contaminante y se concluye que no existe interacción entre las variables (tiempo y concentración), es decir que no influye sobre el porcentaje de inhibición.

6. RECOMENDACIONES

Es importante, evaluar y realizar seguimientos a la interacción del uso de los agentes desinfectantes seleccionados con otro tipo de factores, como físicos (humedad, temperatura) y químicos, que puedan disminuir la concentración de Procide requerida del mismo (1 % por 15 min y 20 min, 1,5 % a 15 min y 20 min) para minimizar costos de producción y pérdidas.

Antes de recurrir a implementar y usar nuevos agentes químicos biocidas, se debería revisar su composición química, CMI y eficacia, debido a que estos pueden dejar elementos trazas y generar resistencia a los microorganismos, así mismo, exponer al producto final a contaminación microbiana o química, cuando se desconoce su cinética y manejo. De igual importancia se debe manejar una rotación de desinfectantes que no presenten la misma composición química y principio activo, que pueda generar una mayor resistencia al componente presente.

Las industrias de alimentos deben realizar identificaciones de los microorganismos que se encuentran presentes en cada área, puesto que el porcentaje de inhibición de los desinfectantes se limita normalmente por sus características químicas a cierto grupo de microorganismos, lo que podría conllevar a la resistencia microbiana de otras especies intrusas, ya que posiblemente son los que contaminan el producto en las últimas etapas del proceso de manufactura.

Se recomienda, la verificación continua mediante la frecuencia establecida en los POES de las BPM, y aquellos puntos críticos de control (PCC). Para esto se debería utilizar los métodos microbiológicos y rápidos (detección de ATP), como también la eficacia de los agentes químicos a nivel *in vitro* por periodo de tiempo y lotes nuevos de desinfectantes que ingresan a las plantas de alimentos, y con apoyo de registros detallados de las concentraciones utilizadas, los tiempos de exposición y los resultados obtenidos en cada aplicación. Así mismo se debe identificar a nivel molecular de los contaminantes que persisten y representan riesgos asociados a la producción y calidad del proceso y producto final, esto con el fin de conocer a nivel exacto la especie intrusa y su comportamiento en otros escenarios.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Aguayo, E., Gómez, P., Artés-Hernández, F., & Artés, F. (2017). Tratamientos químicos desinfectantes de hortalizas de IV gama: ozono, agua electrolizada y ácido peracético. *Agrociencia (Uruguay)*, 21(1), 7-14. Recuperado de: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=S2301-15482017000100007&script=sci_arttext.
- Alba, N., & Araujo, F. (2008). *Evaluación de los desinfectantes utilizados en el proceso de limpieza y desinfección del área de Fitoterapeuticos de Laboratorio*. Repositorio Institucional - Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado de: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8246/tesis232.pdf;jsessionid=B9716F9A40D1158C06BA65EB58D85841?sequence=1>.
- Aragão, B. B., Trajano, S. C., de Oliveira, R. P., da Conceição Carvalho, M., de Carvalho, R. G., Juliano, M. A., ... & Mota, R. A. (2022). Occurrence of emerging multiresistant pathogens in the production chain of artisanal goat coalho cheese in Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 84, 101785. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014795712200042X>.
- Ayala, D. (2018). *Escuela profesional de ingeniería industrial facultad de ingeniería y arquitectura*. Repositorio de la ucv. Recuperado de: https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/63109/Delgado_AJR-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Beltran, C. H. (2018). *Tendencias industriales de limpieza y desinfección en un laboratorio de sabores*. Recuperado de: <https://repositorio.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/20937/80019840.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Betoret Valls, N., Pérez Esteve, E., Barrera Puigdollers, M. C., & Castelló Gómez, M. L. (2021). Operaciones auxiliares de limpieza y desinfección en la industria agroalimentaria. Recuperado de: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/165529/Betoret%3bP%3ba9rez%3bBarrera%20->

[%20Lmpeza%20e%20hgene%20en%20lasndustras%20agroalimentaras.pdf?sequence=1&isAllowed=y.](#)

Bonifaz Trujillo, J. Alexandro (2010) *Micología médica básica*. 4a ed. Mc Graw Hill, México D.F.. ISBN 9786071507440.

Boutrou, R. y Guéguen, M. (2005) "Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology", *International Journal of Food Microbiology*, 102(1), pp. 1-20.

Britton, B. C., Sarr, I., & Oliver, H. F. (2021). Enterobacteriaceae, coliform, yeast, and mold contamination patterns in peanuts compared to production, storage, use practices, and knowledge of food safety among growers in Senegal. *International Journal of Food Microbiology*, 360, 109437. Recuperado de:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160521003962>.

Butler, E. E., Webster, R. K. y Eckert, J. W. (1962) "Taxonomy, pathogenicity and physiological properties of the fungus causing sour rot of citrus", *Phytopathology*, 55(11), pp. 1262-1268.

Cabrera, Cristina Eugenia, Gómez, Rommel Fabián, & Zúñiga, Andrés Edmundo. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38(2), 149-158. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95342007000200008&lng=en&tlng=es.

Chacón-Jiménez, L., & Rojas-Jiménez, K. (2020). Resistencia a desinfectantes y su relación con la resistencia a los antibióticos. *Acta médica costarricense*, 62(1), 7-12.

Chou, K., Yan, C. T., & Hsiao, H. I. (2023). Identification of postbaking mold contamination through onsite monitoring of baking factory environment: A case study of bakery company in Taiwan. *Food Control*, 145, 109495. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713522006880>.

Colcha, L. F. (2021). *Agentes antimicrobianos naturales de origen vegetal usados en la conservación de frutas y hortalizas*. Repositorio Digital UNACH. Recuperado de:

<http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/7581/1/7.%20Trabajo%20Final%20Luis%20Colcha.pdf> .

- Deshpande, A., Mana, T. S., Cadnum, J. L., Jencson, A. C., Sitzlar, B., Fertelli, D., ... & Donskey, C. J. (2014). Evaluation of a sporicidal peracetic acid/hydrogen peroxide–based daily disinfectant cleaner. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 35(11), 1414-1416. Recuperado de: <https://www.cambridge.org/core/journals/infection-control-and-hospital-epidemiology/article/abs/evaluation-of-a-sporicidal-peracetic-acidhydrogen-peroxidebased-daily-disinfectantcleaner/70394f9134d890e5676d2dbda5f7807a>.
- Di Serio, M., Tesser, R., & Santacesaria, E. (2001). A kinetic and mass transfer model to simulate the growth of baker's yeast in industrial bioreactors. *Chemical Engineering Journal*, 82(1-3), 347-354. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1385894700003533#preview-section-cited-by>.
- Diario Oficial de la Unión Europea. (2012). *Reglamento (UE) no 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de mayo de 2012, relativo a la comercialización y el uso*. BOE.es. Recuperado de: <https://www.boe.es/doue/2012/167/L00001-00123.pdf>.
- Duarte, 1995. Franco Andrade, M. L. (2019). *Diseño de un bioreactor para la producción de levadura (Saccharomyces cerevisiae) de panificación, utilizando como sustrato melaza para la empresa panificadora LEFSKI-PAN* (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).
- Eliskases-Lechner, F., GuÚguen, M., & Panoff, J. M. (2022). *Geotrichum candidum. Factores determinantes de las enfermedades transmitidas por alimentos. factores de contaminación, supervivencia y multiplicación* (no date) *Topics - PAHO/WHO | Pan American Health Organization*. Available at: <https://www.paho.org/en/topics> (Accessed: 12 August 2023).
- Fáisca, F., Filipe, L., Petrovski, Z., Santos, M. M., Gago, S., & Branco, L. C. (2021). Ionic Systems and Nanomaterials as Antiseptic and Disinfectant Agents for Surface Applications: A Review. *Surfaces*, 4(2), 169–190. MDPI AG. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.3390/surfaces4020016>.

- Fernández, S., Marcía, J., Bu, J., Baca, Y., Chavez, V., Montoya, H., Varela, I., Ruiz, J., Lagos, S., & Ore, F. (2021). Enfermedades transmitidas por Alimentos (Etas); Una Alerta para el Consumidor . *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 5(2), 2284-2298. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i2.433.
- Freire Muñoz, Diego Armando. (2021). Estudio de coliformes totales, mohos y levaduras en panaderías de la ciudad Ambato. *Revista Universidad y Sociedad*, 13(3), 477-483. Epub 02 de junio de 2021. Recuperado en 19 de abril de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2218-36202021000300477&lng=es&tlng=es.
- Fuentes, K. A. (2022). *Efecto de la interacción hongo-bacteria sobre la degradación de materia orgánica, en sedimentos marinos costeros*. Repositorio UdeC. Recuperado de: <http://repositorio.udec.cl/bitstream/11594/9959/1/Karina%20Fuentes%20Tesis.Image.Marked.pdf>.
- Gálvez Anatibia, P. (2022). Evaluación del efecto de la implementación de las buenas prácticas de manufactura (BPM) sobre los parámetros de calidad en una línea de salsas y aderezos. [Tesis de magister, universidad de Chile]. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/192346>
- García Orozco, María Alejandra (2021). Aislamiento e identificación de microorganismos ambientales en una planta de salsas y condimentos de acuerdo con el programa de monitoreo ambiental en tiempos de covid-19. [Trabajo de grado, Universidad para la cooperación internacional (uci)] <https://omeka.campusuci2.com/biblioteca/files/original/5d468bf485f651bd767dde727434712222.pdf>
- García Saucedo, S. M. (2013). Análisis microbiológico de productos no estériles y dietéticos elaborados por la industria farmacéutica nacional.
- García, G., & Carolina, D. (2021). *Universidad nacional de piura*. Universidad nacional de piura. Recuperado de: <https://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12676/2763/IAIA-GUZ-GAR-2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

- Gente, S., Sohler, D., Coton, E., Duhamel, C., & Gueguen, M. (2006). Identification of *Geotrichum candidum* at the species and strain level: proposal for a standardized protocol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(12), 1019-1031.
- Geronikou, A., Larsen, N., Lillevang, S. K., & Jespersen, L. (2023). Diversity and succession of contaminating yeasts in white-brined cheese during cold storage. *Food Microbiology*, 113, 104266. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002023000539>.
- Ghosh, P. y Boler, AK (2020). *Geotrichum candidum*: Un patógeno primario raro en la geotricosis pulmonar. *The Indian Journal of Medical Research*, 152 (Suppl 1), S123.
- Gómez, P. L., & Doñate, R. M. (2019). Conceptos básicos sobre antisepsia y antisépticos. *Medicina Intensiva*, 43, 2-6.
- Gonzalez Martinez, Jose, & Rey Bautista, Francisco (2017). *Procesos básicos de pastelería y repostería*. Ediciones Paraninfo, SA. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=sTLDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=La+levadura+fresca+es+un+elemento+esencial+en+la+industria+de+la+panader%C3%ADa+y+la+pasteler%C3%ADa,+desempe%C3%B1ando+un+papel+fundamental+en+la+fermentaci%C3%B3n+de+la+masa+y+la+obtenci%C3%B3n+de+productos+horneados+de+alta+calidad&ots=L2oo7mvlbd&sig=FUH-1K08sJrfXMyumW5YFxMmc2l#v=onepage&q&f=false>.
- González, C. (2005). Validación retrospectiva y control estadístico de procesos en la industria farmacéutica (Trabajo de Titulación, Universidad de Chile). Recuperado de: https://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2005/gonzalez_c/sources/gonzalez_c.pdf.
- González, G. A. O., Mora, A. J. T., Yáñez, J., Moreno, E. I. G., & Coba, M. S. M. (2021). Evaluación de la eficacia de cinco desinfectantes comerciales, aplicables en la cadena productiva de musáceas, contra cinco cepas de *Fusarium spp.* *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas: REMCB*, 42(1), 11-25. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8575335>.

- Guía Feliche, G. A. (2019). *Producción de levadura de panificación (Saccharomyces cerevisiae) en un medio de cultivo formulado a base de melaza de caña de azúcar* (Doctoral dissertation). Recuperado de: <http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/20472/1/Tesis%20Gabriel%20Guia%20Feliche%20CD.pdf>.
- Gutiérrez Velasco, P. E., & Da Silva, D. C. (2020). Relación entre alimentos elaborados y presencia de microorganismos (Coliformes totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) en el comedor de una universidad privada de Lima, 2019.
- Held, P. *Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of Saccharomyces cerevisiae*. [en línea]. E.E.U.U. 2010. p. 4. [Consulta: 11 de agosto 2018]. Disponible en: <https://www.biotek.com/resources/application-notes/monitoring-growth-of-beer-brewingstrains-of-saccharomyces-cerevisiae-the-utility-of-synergy-h1-for-providing-high-qualitykinetic-data-for-yeast-growth-applications/>
- Hernández Navarrete, M.-J., Celorrio-Pascual, J.-M., Lapresta Moros, C., & Solano Bernad, V.-M. (2014). Fundamentos de antisepsia, desinfección y esterilización. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 32(10), 681–688. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.04.003>.
- Hernández, Y., & Gonzalez, M. E. (2010). *Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes*. Scielo Cuba. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015.
- Hoogs G. S., Guarro J. (2019). Atlas of clinical fungi.,³nd edition CBS. On-line version. Recuperado de: <https://www.clinicalfungi.org/>.
https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=contaminaci%C3%B3n+primaria+y+secundaria+en+alimentos+&btnG=#d=gs_qabs&t=1700276521023&u=%23p%3DzXQBFbnmzs4J
- Huánuco Azabache, L., Cevallos Ampuero, J., & Campos Contreras, C. (2021). Validez y fiabilidad de una lista de verificación en Buenas Prácticas de Manufactura para la industria de agrobiológicos. *Industrial data*, 24(2), 175-191.

- Icontec. *Industria alimentaria. levadura para panificación*. (2012). Tienda virtual ICONTEC. Recuperado de: <https://tienda.icontec.org/gp-industria-alimentaria-levadura-para-panificacion-ntc1807-2012.html>.
- IDEXX. (2022). Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Disponible en: <https://www.idexx.es/files/mic-gui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf>.
- Insst, M. de trabajo (2023) *Penicillium spp. - agentes biológicos - hongo - portal INSST - INSST, Portal INSST*. Available at: <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/penicillium-spp> (Accessed: 19 November 2023).
- Instituto nacional de salud. (2022). Protocolo de Vigilancia de Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Versión 04. <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Lineamientos/Pro ETA%202022.pdf>.
- Jácome Pilco, C., Moreno Mejía, C., Mazabanda Toalombo, R., Merino Azogue, D., & Patín Báez, M. (2023). Identificación y cuantificación de levaduras *Saccharomyces Cerevisiae* en la fermentación de mostos de vinos: Identification and quantification of *Saccharomyces Cerevisiae* yeasts in the fermentation of wine musts. *LATAM Revista Latinoamericana De Ciencias Sociales Y Humanidades*, 4(1), 2430–2445. Doi: <https://doi.org/10.56712/latam.v4i1.427>
- Keene, S., Sarao, M. S., McDonald, P. J., & Veltman, J. (2019). Cutaneous geotrichosis due to *Geotrichum candidum* in a burn patient. *Access microbiology*, 1(1).
- Kieliszek, M., Błażejczak, S. y Płaczek, M. (2016). Evaluación espectrofotométrica de la unión de selenio por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC MYA-2200 y *Candida utilis* ATCC 9950. *Revista de elementos traza en medicina y biología*, 35, 90-96.
- King, T., Cole, M., Farber, J. M., Eisenbrand, G., Zabarar, D., Fox, E. M., & Hill, J. P. (2017). Food safety for food security: Relationship between global megatrends and developments in food safety. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 160-175. Recuperado de:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S09242244163037>

03.

- Koňuchová, M. y Valík, L. (2021) "Modelling the radial growth of *Geotrichum candidum*: effects of temperature and water activity", *Microorganisms*, 9(3):532.
- Kyanko, María V, Russo, Mara L, Fernández, Mariela, & Pose, Graciela. (2010). Efectividad del Acido Peracético sobre la reducción de la carga de Esporas de Mohos causantes de Pudrición Poscosecha de Frutas y Hortalizas. *Información tecnológica*, 21(4), 125-130. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642010000400016>.
- León, J., Ortiz, J., Astudillo, D., Astudillo, G., & Donoso, S. (2023). Control microbiológico de alimentos en la vía pública en Cuenca, Ecuador. *Revista chilena de nutrición*, 50(3), 261-270.
- Llanos, L., & Capera, D. (2019). *Propuesta de aplicación de herramientas de manufactura esbelta para reducir el tiempo perdido en el proceso productivo de la em.* Biblioteca Digital Univalle. Recuperado de: <https://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/handle/10893/18746/06/02412.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Magdovitz, BF, Gummalla, S., Thippareddi, H. y Harrison, MA (2020). Evaluación de protocolos de monitoreo ambiental para *Listeria spp.* y *Listeria monocytogenes* en instalaciones de fabricación de alimentos congelados. *Diario de Protección de Alimentos*, 83 (1), 172-187. <https://meridian.allenpress.com/jfp/article-abstract/83/1/172/425639>
- Martínez-Hernández, G. B., Navarro-Rico, J., Gómez, P. A., Otón, M., Artés, F., & Artés-Hernández, F. (2015). Combined sustainable sanitising treatments to reduce *Escherichia coli* and *Salmonella Enteritidis* growth on fresh-cut kailan-hybrid broccoli. *Food Control*, 47, 312-317.
- Martínez, R. M. G. (2013). Contaminación de los alimentos durante los procesos de origen y almacenamiento. *Aldaba: revista del Centro Asociado a la UNED de Melilla*, (36), 51-64. Recuperado de:
- Mejía-Barajas, J. A., Montoya-Pérez, R., Cortés-Rojo, C., & Saavedra-Molina, A. (2016). Levaduras termotolerantes: aplicaciones industriales, estrés oxidativo y respuesta Antioxidante. *Información tecnológica*, 27(4), 03-16.

- Morocho Catota, W. A. (2020). *Estudio bibliográfico sobre métodos aplicables para la evaluación microbiológica de la eficiencia de un desinfectante* (Bachelor's thesis, Quito: UCE). Recuperado de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/22543/1/T-UCE-0008-CQU-286.pdf>.
- Myint, T., Dykhuizen, M. J., McDonald, C. H., & Ribes, J. A. (2015). Post operative fungal endophthalmitis due to *Geotrichum candidum*. *Medical mycology case reports*, 10, 4-6.
- Naranjo, M. (2015). *Pontificia universidad católica del ecuador escuela de bioanálisis disertación previa a la obtención del título de licencia*. Repositorio PUCE. Recuperado de: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/7709/Tesis%20Lourdes%20Naranjo1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Oeste, A. M., Teska, P. J., Defensa, C. B., & Foliver, h. (2018, April 3). *Strain, disinfectant, concentration, and contact time quantitatively impact disinfectant efficacy - Antimicrobial Resistance & Infection Control*. Antimicrobial Resistance & Infection Control. Recuperado de: <https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-018-0340-2#citeas>.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(1), 1.
- Pastor-Tudela, A. I., Pérez-González, D., Jiménez-Montero, B., & de Malet Pintos-Fonseca, A. (2021). Fungemia relacionada con catéter por *Geotrichum capitatum* en una paciente pediátrica inmunocompetente. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 39(7), 363-364.
- Patiño, D., Perez, L., Torres, M., Filippo, G., & Rosas, D. (2018). *Uso de biocidas y mecanismos de respuesta bacteriana*. Scielo Cuba. Retrieved April 25, 2023, from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002018000300014.
- Pérez Esteve, E., Barrera Puigdollers, M. C., & Castelló Gómez, M. L. (2017). *Métodos para la desinfección en la industria alimentaria*. Disponible en:

[https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/84175/P%
c3%a9rez%3bBarra%3bCastell%
c3%b3%20-%20M%
c3%a9todos%20para%20la%20desinfecci%
c3%b3n%20en%20la%20industria%20alimentaria.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/84175/P%c3%a9rez%3bBarra%3bCastell%c3%b3%20-%20M%c3%a9todos%20para%20la%20desinfecci%c3%b3n%20en%20la%20industria%20alimentaria.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

- Portales, S. (2020). *Estudio de la calidad microbiológica de panes de distintos orígenes*. UVaDOC Principal. Recuperado de: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/49306/TFM-L543.pdf?sequence=1>.
- Pottier, I., Gente, S., Vernoux, J. P. y Guéguen, M. (2008) "Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*", *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), pp. 327-332.
- Prakash, P. Y., Seetaramaiah, V. K., Thomas, J., Khanna, V., & Rao, S. P. (2012). Renal fungal bezoar owing to *Geotrichum candidum*. *Medical mycology case reports*, 1(1), 63-65. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211753912000334>.
- Prakash, P. Y., Seetaramaiah, V. K., Thomas, J., Khanna, V., & Rao, S. P. (2012). Renal fungal bezoar owing to *Geotrichum candidum*. *Medical mycology case reports*, 1(1), 63-65.
- Prillinger, H., Molnár, O., Eliskases-Lechner, F., & Lopandic, K. (1999). Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. *Antonie van Leeuwenhoek*, 75, 267-283.
- Rabán, J., & Claudia, M. (2021). *Revisión de la limpieza y desinfección en una fábrica de helados* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Luján).
- Ramírez, J., Parra, J., & Aldana, A. (2017). *Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos*. | *Mente Joven*. Revistas Universidad Libre. Recuperado de: https://doi.org/10.18041/2323-0312/mente_joven.0.2017.3665
- Ramírez, L. S., & Marin Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*, XV(42), 263-268.
- Reyes, A. (2020). Estudio comparativo entre técnicas de recuento en placa tradicional y placas 3m™ petrifilm™ para la enumeración de moh. UniPamplona. Recuperado de:

http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/bitstream/20.500.12744/3268/1/Reyes_2020_TG.pdf.

- Rodelo, H. R., Capote, A. M., Contreras, S., & DF, A. C. (2018). Cinética de crecimiento de aislamientos autóctonos de *aspergillus* sección fumigati. *Vitae: Academia Biomédica Digital*, (74), 1.
- Rodríguez, E. (2015). Consideraciones importantes en el uso de desinfectantes. *Instituto de Salud Pública. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile, 20015*, 1-38.
- Romero Veramendi, A. R., & Baldeón Mendoza, I. V. (2021). Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las flores de *Tropaeolum majus* L.(mastuerzo), frente a *Staphylococcus epidermidis*, por la técnica de Kirby-Bauer.
- Ruiz de Azúa Baños, A. M. (2022). *Geotrichum candidum*: propiedades y uso como cultivo protector en quesos. Recuperado de: [https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/15595/Ruiz%20de%20Az%C3%BAa Ba%C3%B1os Alberto%20Mar%C3%ADa.pdf?sequence=1](https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/15595/Ruiz%20de%20Az%C3%BAa%20Ba%C3%B1os%20Alberto%20Mar%C3%ADa.pdf?sequence=1).
- Safetyculture. (2021). Good Manufacturing Practices. Obtenido de <https://safetyculture.com/topics/gmp/>.
- Sánchez, L., & Saenz, E. (2005). *Antisépticos y desinfectantes*. Dermatología Peruana. Recuperado de: http://metabase.uaem.mx/bitstream/handle/123456789/1468/280_4.pdf.
- Sango, E. (2019, June 27). *Efectividad de cinco agentes antimicrobianos en distintos tiempos para la desinfección de conos de gutapercha: estudio in vitro*. Universidad central del ecuador facultad de odontología carrera de odontología. Recuperado de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/18751/1/T-UCE-0015-ODO-173.pdf>.
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 50(1), 20-28.

- Taylor, J. H., Rogers, S. J., & Holah, J. T. (1999). A comparison of the bactericidal efficacy of 18 disinfectants used in the food industry against *Escherichia coli* O157: H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at 10 and 20 C. *Journal of Applied Microbiology*, 87(5), 718-725. Recuperado de: <https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/87/5/718/6721107?login=false>.
- Unicef. (2020). *Estado mundial de la infancia 2019: Niños, alimentos y nutrición- Crecer bien en un mundo en transformación*. United Nations. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>.
- Valdés, B. E. (2007). *Aplicación de diferentes técnicas analíticas para evaluar la contaminación fúngica de alimentos y superficies*. Universidad autonoma del Barcelona. Recuperado de: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5690/bevd1de1.pdf?sequence=1>.
- Valencia Montero, V., & Acero Plazas, V. (2013). Comparación de ácido láctico, ácido peroxiacético e hipoclorito de sodio en la desinfección de canales bovinas en un frigorífico de Bogotá, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (26), 13-23.
- Valencia Villarreal, P. G. (2017). Evaluación de la eficacia de los procesos de limpieza y desinfección en la gestión de saneamiento de los Laboratorios del Programa de Bacteriología y Laboratorio clínico de la Udes campus cúcuta. Recuperado de: <https://repositorio.udes.edu.co/server/api/core/bitstreams/019bbf36-9b97-4b6a-9cbe-1e70b42e68df/content>.
- Vandevenne, C. A., & Ribes, M. E. (2002). *Métodos de análisis microbiológicos de alimentos*. Ediciones Díaz de Santos.
- Villanueva, I. S. G. (2016). *Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de un desinfectante de uso hospitalario y de uso comercial*. Recuperado de: https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/81082/1/TG01513.pdf

Von Arx, J. A. (1977) "Notes on *Dipodascus*, *Endomyces* and *Geotrichum* with the description of two new species", *Antonie van Leeuwenhoek*, 43(3-4), pp. 333-340.

WELLS, J.M. *Sour rot of peaches caused by Monilia implicata and Geotrichum candidum*. *Phytopathology*, St. Paul, v .67, n.3, p.404-408, Mar.1977.
Recuperado de:
https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1977Articles/Phyto67n03_404.PDF.

WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths [Internet]. *Who.int*. [citado el 10 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/03-12-2015-who-sfirst-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>.

Yaguapaz Cortez, A. G. (2023). *Aislamiento y evaluación de la resistencia a los antimicrobianos en Salmonella spp, a partir de hisopados rectales y tejidos de cuyes (cavia porcellus) en criaderos de los cantones Pujilí y Latacunga de la provincia de Cotopaxi* (Bachelor's thesis, Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)).

8. ANEXOS

Anexo 1.

Resultados obtenidos de las muestras recolectadas de Ambientes, Personal manipulador, Superficies utensilios/equipos y producto terminado, para determinar la fuente de contaminación por *G. candidum*.

	Semanas		1		2		3		4	
	Microorganismo	H	L	H	L	H	L	H	L	
Equipos	UFC/20cm³									
	Mezclador	3	0	2	20	0	0	0	0	0
	Ojal cortador	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Moldeador	0	25	2	30	0	0	0	0	0
Utensilios	Balde 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Balde 2	7	0	0	0	0	0	0	0	0
	Balde 3	0	0	0	3	0	0	0	0	0
	Balde 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Superficies	Superficie injet	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Banda transportadora blanca	0	0	0	0	1	3	0	1	
	Bajante mezclador	0	120	0	16	1	1	0	1	
Personal manipulador	Manipulador 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Manipulador 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Manipulador 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Manipulador 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Manipulador 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Manipulador 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ambiente	UFC/15min									
	Ambiente A (Mezclador)	2	0	3	0	5	0	3	0	
	Ambiente B (Injet)	3	0	4	0	0	0	1	0	
	Ambiente C (Tanque oleína)	0	0	2	0	5	0	2	0	
Producto terminado	UFC/25cm³									
	Muestra 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Muestra 2	0	0	0	0	7	0	0	0	
	Muestra 3	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Muestra 4	0	0	0	0	0	0	0	0	

Muestra 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestra 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo 2.

Resultados del recuento microbiano en (UFC/m¹) del ensayo in vitro con Procide (Ácido peracético 18% + Peróxido de hidrógeno 12%).

Tiempo	Concentración	Resultados/UFC	% inhibición	media (\bar{X})	Desviación (σ)	
10 min	0,5%	r1	3400000	92%	92%	2%
		r2	2900000	93%		
		r3	4600000	89%		
	1%	r1	0	100%	100%	0%
		r2	0	100%		
		r3	0	100%		
	1,5%	r1	0	100%	100%	0%
		r2	0	100%		
		r3	0	100%		
15 min	0,5%	r1	4500000	89%	92%	2%
		r2	2700000	94%		
		r3	3600000	92%		
	1%	r1	0	100%	100%	0%
		r2	0	100%		
		r3	0	100%		
	1,5%	r1	0	100%	100%	0%
		r2	0	100%		
		r3	0	100%		
20 min	0,5%	r1	2900000	93%	94%	1%
		r2	2700000	94%		
		r3	1800000	96%		
	1%	r1	0	100%	100%	0%
		r2	0	100%		
		r3	0	100%		
	1,5%	r1	0	100%	100%	0%
		r2	0	100%		
		r3	0	100%		

ANOVA PROCIDE FACTORIAL 3²

Regresión factorial general: %Inhibición vs. Tiempo, Concentración

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tiempo	3	1, 2, 3
Concentración	3	1, 2, 3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	358.741	44.843	31.04	0.000
Lineal	4	347.926	86.981	60.22	0.000
Tiempo	2	5.407	2.704	1.87	0.183
Concentración	2	342.519	171.259	118.56	0.000
Interacciones de 2 términos	4	10.815	2.704	1.87	0.159
Tiempo*Concentración	4	10.815	2.704	1.87	0.159
Error	18	26.000	1.444		
Total	26	384.741			

Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)	R-cuadrado (pred)
1.20185	93.24%	90.24%	84.79%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	97.481	0.231	421.46	0.000	
Tiempo					
1	-0.370	0.327	-1.13	0.272	1.33
2	-0.259	0.327	-0.79	0.438	1.33
Concentración					
1	-5.037	0.327	-15.40	0.000	1.33
2	2.519	0.327	7.70	0.000	1.33
Tiempo*Concentración					
1 1	-0.741	0.463	-1.60	0.127	1.78
1 2	0.370	0.463	0.80	0.434	1.78
2 1	-0.519	0.463	-1.12	0.277	1.78
2 2	0.259	0.463	0.56	0.582	1.78

Ecuación de regresión

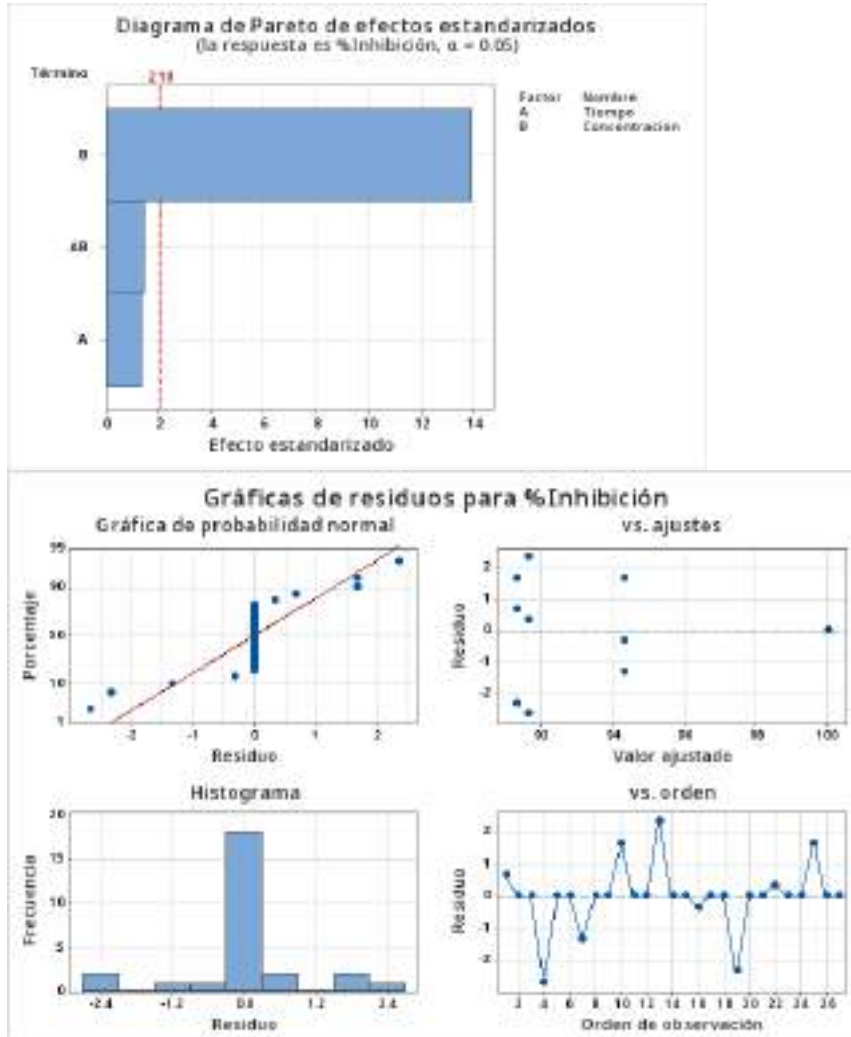
$$\begin{aligned}
 \% \text{Inhibición} = & 97.481 - 0.370 \text{Tiempo}_1 - 0.259 \text{Tiempo}_2 + 0.630 \text{Tiempo}_3 \\
 & - 5.037 \text{Concentración}_1 + 2.519 \text{Concentración}_2 + 2.519 \text{Concentración}_3 \\
 & - 0.741 \text{Tiempo*Concentración}_1 1 + 0.370 \text{Tiempo*Concentración}_1 2 \\
 & + 0.370 \text{Tiempo*Concentración}_1 3 - 0.519 \text{Tiempo*Concentración}_2 1 \\
 & + 0.259 \text{Tiempo*Concentración}_2 2 + 0.259 \text{Tiempo*Concentración}_2 3 \\
 & + 1.259 \text{Tiempo*Concentración}_3 1 - 0.630 \text{Tiempo*Concentración}_3 2 \\
 & - 0.630 \text{Tiempo*Concentración}_3 3
 \end{aligned}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	%Inhibición	Ajuste	Resid	Resid est.
-----	-------------	--------	-------	------------

4	89.000	91.667	-2.667	-2.72 R
13	94.000	91.667	2.333	2.38 R
19	89.000	91.333	-2.333	-2.38 R

Residuo grande R



Anexo 3.

Resultados del recuento microbiano en (UFC/ml) del ensayo *in vitro* con Logos
(Ácido peracético 5% + Peróxido de hidrógeno 15% + Ácido acético 5%)

Tiempo	Concentración	resultados/UFC	% inhibición	media (\bar{X})	Desviación (σ)	
10 min	0,5%	r1	3000000	93%	92%	2%
		r2	4800000	89%		
		r3	2900000	93%		
	1%	r1	3100000	93%	94%	2%
		r2	3000000	93%		
		r3	1800000	96%		
	1,5%	r1	3900000	91%	92%	2%
		r2	2600000	94%		
		r3	3400000	92%		
15 min	0,5%	r1	3200000	93%	92%	1%
		r2	3100000	93%		
		r3	3700000	91%		
	1%	r1	2900000	93%	93%	3%
		r2	4300000	90%		
		r3	2100000	95%		
	1,5%	r1	3400000	92%	93%	1%
		r2	2900000	93%		
		r3	3300000	92%		
20 min	0,5%	r1	3600000	92%	92%	1%
		r2	3500000	92%		
		r3	3000000	93%		
	1%	r1	1800000	96%	94%	1%
		r2	2400000	94%		
		r3	2900000	93%		
	1,5%	r1	2100000	95%	94%	1%
		r2	2700000	94%		
		r3	2900000	93%		

ANOVA DISEÑO FACTORIAL 3² LOGOS

Regresión factorial general: %Inhibición vs. Tiempo, Concentración

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tiempo	3	1, 2, 3
Concentración	3	1, 2, 3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	25.333	3.167	1.38	0.270
Lineal	4	13.556	3.389	1.48	0.251
Tiempo	2	2.667	1.333	0.58	0.570
Concentración	2	10.889	5.444	2.37	0.122
Interacciones de 2 términos	4	11.778	2.944	1.28	0.314
Tiempo*Concentración	4	11.778	2.944	1.28	0.314
Error	18	41.333	2.296		
Total	26	66.667			

Resumen del modelo

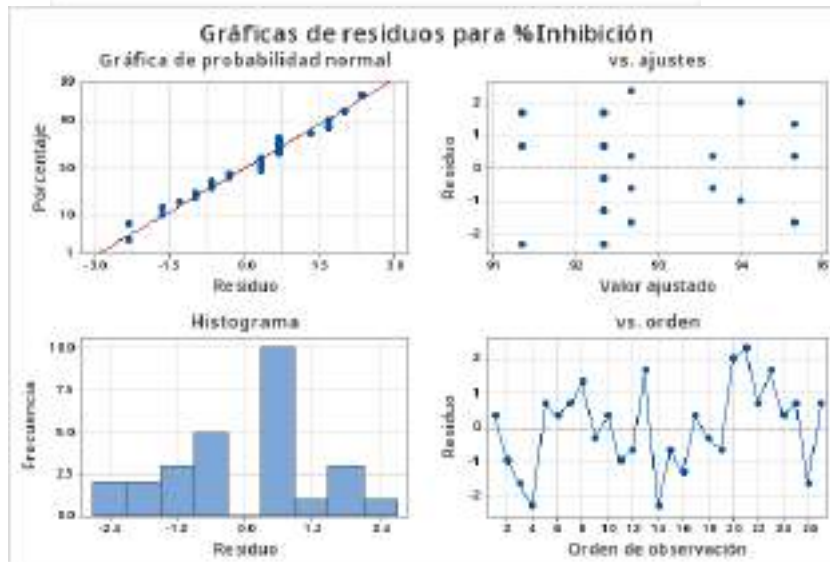
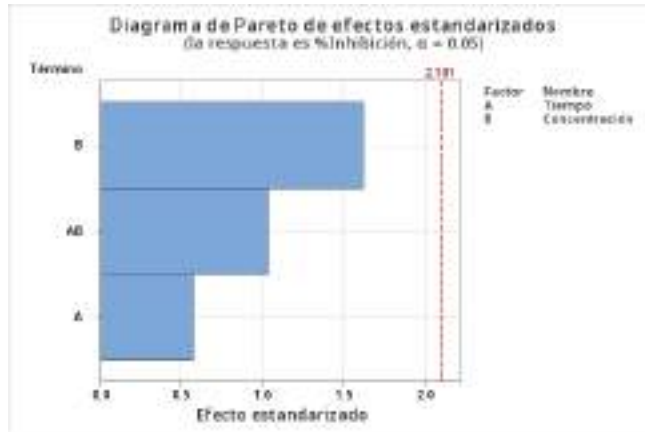
S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)	R-cuadrado (pred)
1.51535	38.00%	10.44%	0.00%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	92.889	0.292	318.52	0.000	
Tiempo					
1	0.222	0.412	0.54	0.597	1.33
2	-0.444	0.412	-1.08	0.295	1.33
Concentración					
1	-0.778	0.412	-1.89	0.076	1.33
2	0.778	0.412	1.89	0.076	1.33
Tiempo*Concentración					
1 1	0.333	0.583	0.57	0.575	1.78
1 2	0.111	0.583	0.19	0.851	1.78
2 1	-0.333	0.583	-0.57	0.575	1.78
2 2	-0.889	0.583	-1.52	0.145	1.78

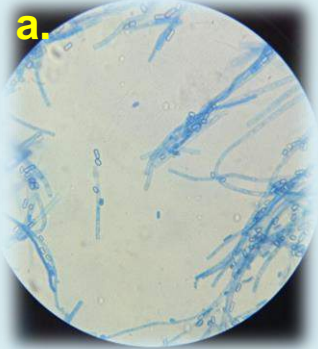

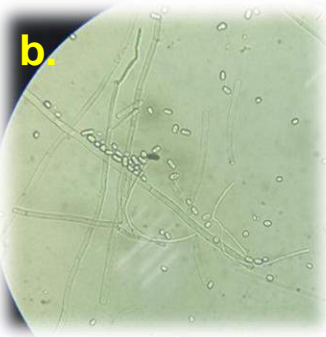
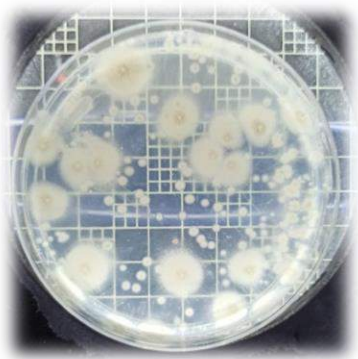
Ecuación de regresión

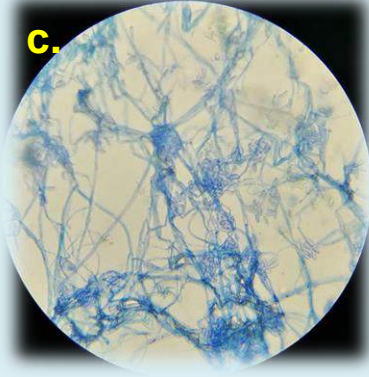

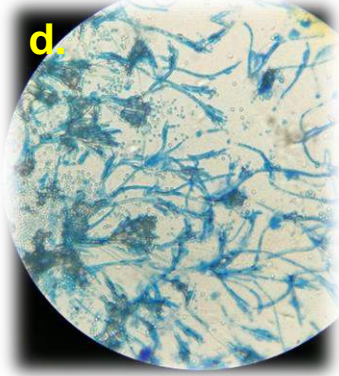

$$\begin{aligned}
 \% \text{Inhibición} = & 92.889 + 0.222 \text{ Tiempo}_1 - 0.444 \text{ Tiempo}_2 + 0.222 \text{ Tiempo}_3 \\
 & - 0.778 \text{ Concentración}_1 + 0.778 \text{ Concentración}_2 + 0.000 \text{ Concentración}_3 \\
 & + 0.333 \text{ Tiempo*Concentración}_1 1 + 0.111 \text{ Tiempo*Concentración}_1 2 \\
 & - 0.444 \text{ Tiempo*Concentración}_1 3 - 0.333 \text{ Tiempo*Concentración}_2 1 \\
 & - 0.889 \text{ Tiempo*Concentración}_2 2 + 1.222 \text{ Tiempo*Concentración}_2 3 \\
 & + 0.0 \text{ Tiempo*Concentración}_3 1 + 0.778 \text{ Tiempo*Concentración}_3 2 \\
 & - 0.778 \text{ Tiempo*Concentración}_3 3
 \end{aligned}$$



Anexo 4.

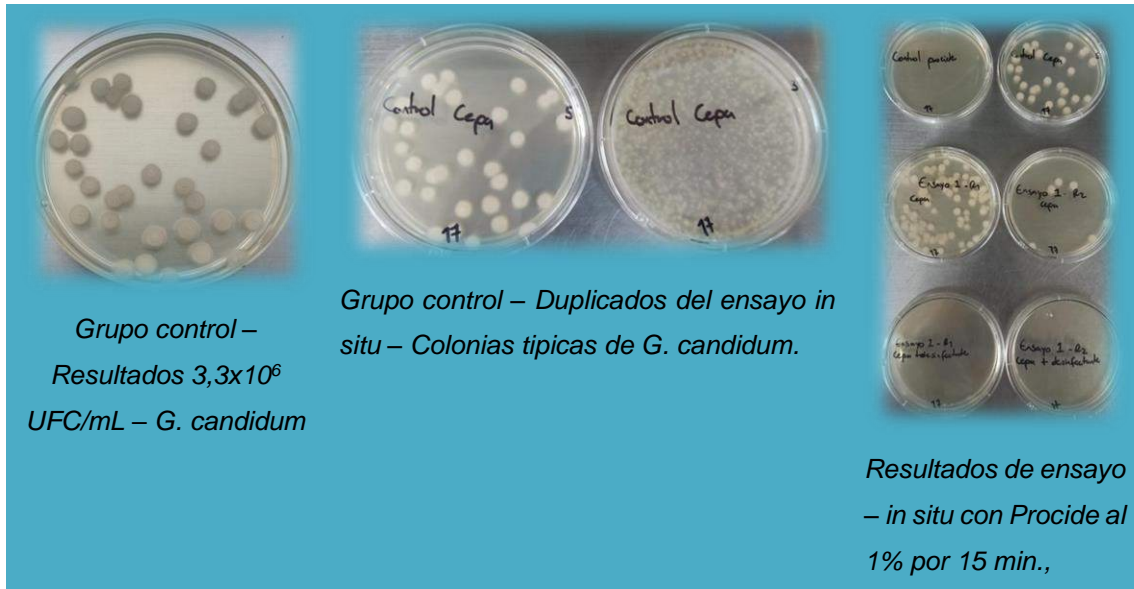
Descripción macroscópica y microscópica de Hongos y Levaduras (HyL) presentes en el área de corte y empaque de levadura, aislados mediante muestreo de ambiente, hisopados y siembra en profundidad en etapas de monitoreo.

Muestra	Características Microscópicas	Características	Características Macroscópicas
Muestra tomada del punto de ambientes A (Mezclador), en la semana 1 de monitoreo.	 <p>a.</p> <p>40x – azul de Lactofenol</p>	<p>La morfología observada son células levaduriforme e hifas hialinas tabicadas gruesas fragmentadas y artroconidios. Las colonias con de color blanco, vellosas, secas, con crecimiento abundante a las 48 horas, Atlas of Clinica Fungi (2023) (https://www.atlasclinicalfungi.org/geotrichumcandidum/). Ruiz (2022). Ruiz (2022).</p>	 <p>Crecimiento de <i>G. candidum</i> en Agar PDA</p>
Muestra recolectadas de Superficies Balde 2, a la segunda semana de monitoreo	 <p>b.</p> <p>40x – azul de Lactofenol</p>	<p>Celulas parecidas a levaduras en crecimiento temprano. Colonias aisladas de <i>G. candidum</i>, según sus características típicas.</p>	 <p>Recuento de colonias de <i>G. candidum</i> en agar PDA</p>

<p>Muestra de Barra de levadura de 500gr en control de calidad pasado 10 días de incubación.</p>	 <p>40x – azul de Lactofenol</p>	<p>La barra de levadura presenta un crecimiento de colonias algodonosas de color blanco. La incubación de estas barras fueron de 28 C.</p>	
<p>Muestra recolectada de ambiente A (Mezclador) segunda semana de monitoreo ambiental</p>	 <p>40x – azul de Lactofenol</p>	<p>Las colonias encontradas en las casas fueron relacionadas para el genero <i>Penicillium</i> ps., según Pitt JI. (1979)., las colonias del hongo en medio PDA mostraron un color verde azulado con superficie plana, con surcos. A nivel microscopico de observaron conidias y estructuras ramificadas en forma de pincel.</p>	 <p>Disponible en línea: https://masam./. (2023). Cultivo de <i>Penicillium</i> sp., en agar PDA</p>

Anexo 5.

Crecimiento en Agar PDA de *G. candidum* a las 48 horas de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, en el ensayo con los desinfectantes y grupo control.



Anexo 6.

Certificado de identificación de la cepa *G. candidum* por el laboratorio SYNLAB

SYNLAB
BIOINDUSTRIAL

INFORME DE LABORATORIO
VERSION No. 02

EMPRESA: XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
SUCURSALE: XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
CONTACTO: LINA ROJAS
AREA: JEFE DE CALIDAD
TELÉFONO: 311 7267
DIRECCIÓN: CRR 364 34A- 64
CORREO: Lina.Rojas@synlab.com.co

REFERENCIA: 13284001829
CODIGO INTERNO: 254-6
FECHA TOMA MUESTRA: 20230829
FECHA RECEPCIÓN: 20230829
FECHA ANALISIS: 20230829
FECHA RESULTADO: 20230829
CÓPIA

LUGAR: XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
MUESTRA: CEP4, 3
MUESTRO REALIZADO POR: CLIENTE
CLASE DE ENVASE: GAMA PETE
CONDICIÓN: NO APLICA

LOTE: NA
FECHA TOMA MUESTRA: 20230829

RESULTADO MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTO

ANÁLISIS	MÉTODO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
Identificación de microorganismos microscópicos	Microscopía	NA	<i>Candida albicans</i>

SIN NORMA

El resultado aplica únicamente a la muestra recibida y analizada.
No se permite la reproducción total o parcial sin el consentimiento escrito del laboratorio.
Falsificación o omisión en la cual sea respectiva, la muestra en el laboratorio.
El plan de muestreo es realizado por el cliente.

Rodrigo Mejía
RODRIGO ANDRÉS MEJÍA MEJÍA
M.D. (BIOLOGÍA)
ANALISTA DE PISO DE MICROBIOLOGÍA

Nancy La Botz
NANCY LA BOTZ
M. (BIOLOGÍA)
JEFE DE LABORATORIO MICROBIOLOGÍA (C)

Fecha de impresión: 08/29/23 a las 10:00 AM
--- FIN DEL INFORME ---