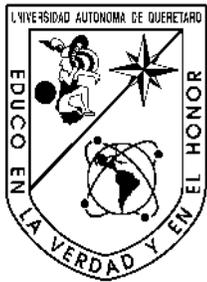


**“Los problemas de los jóvenes solo pueden resolverse por la vía de la educación, jamás por la fuerza, la violencia o la corrupción”  
Javier Barros Sierra**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE  
LA REPÚBLICA (PROPAC)**

**“EVALUACIÓN DEL AGUA ELECTROLIZADA EN LA LIMPIEZA Y  
DESINFECCIÓN DE ACERO INOXIDABLE COMO SUPERFICIE  
MODELO EN EL PROCESAMIENTO DE PRODUCTOS LÁCTEOS”**

**TESIS**

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**Q. A. RODRIGO JIMÉNEZ PICHARDO**

**DIRIGIDO POR:**

**DRA. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ**

**Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre de 2012  
México**



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Evaluación del agua electrolizada en la limpieza y desinfección de acero inoxidable como superficie modelo en el procesamiento de productos lácteos”**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

Q. A. Rodrigo Jiménez Pichardo

**Dirigido por:**

Dra. Blanca Estela García Almendárez

**SINODALES**

Dra. Blanca García Almendárez  
Presidente

Dr. Carlos Regalado González  
Secretario

Dr. Eduardo Castaño Tostado  
Vocal

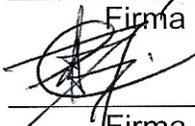
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Suplente

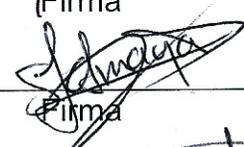
Dr. José Santos Cruz  
Suplente

  
**M.S.P. Sergio Pacheco Hernández**  
Director de la Facultad

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
**Dr. Irineo Torres Pacheco.**  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre 2012  
México

## RESUMEN

El acero inoxidable es uno de los materiales más utilizados en la fabricación de equipos para la industria alimentaria. Se han desarrollado diferentes protocolos de limpieza y desinfección para garantizar la seguridad de los alimentos procesados. Los agentes químicos (álcalis y ácidos fuertes) y el hipoclorito de sodio, son capaces de eliminar residuos de alimentos y microorganismos; actualmente, están siendo reemplazados por agentes menos peligrosos. Un nuevo sistema es el agua electrolizada (AE), que ha demostrado actividad contra microorganismos patógenos y deterioradores, además elimina eficazmente la materia orgánica de las superficies. El objetivo de este estudio fue evaluar un proceso de limpieza y desinfección con AE alcalina y neutra, respectivamente, sobre superficies de acero inoxidable como modelo para equipos de procesamiento de productos lácteos. Se utilizaron placas de acero inoxidable tipo 304-2B, con y sin modificación superficial. Estas placas fueron pre-acondicionadas con leche cruda, seguida por inoculaciones con una mezcla de tres microorganismos, de aproximadamente  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> cada uno (*Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Microococcus luteus*). Se utilizó un diseño experimental para evaluar la eficiencia de la limpieza, usando tres concentraciones de AE alcalina, tres temperaturas y tres tiempos de contacto. Después de cada tratamiento, se realizó una desinfección con AE neutra. La variable respuesta fue la población microbiana, determinada por la técnica de Miles-Misra. El análisis estadístico mostró que el tiempo, la concentración, la modificación, las interacciones tiempo-modificación superficial y temperatura-modificación superficial tuvieron significancia estadística ( $p < 0,05$ ). Se observó una reducción de alrededor de 4 log de la población microbiana. Se compararon dos fuentes de AE neutra, una comercial y otra del CIDETEQ, y los resultados muestran que hay un comportamiento similar en cuanto a la desinfección para ambas. Para realizar la limpieza y desinfección de las placas con modificación superficial fue necesario un tiempo de contacto menor debido a que la superficie no ofrece protección física a los contaminantes. Este novedoso sistema de lavado-desinfección utilizando AE es una alternativa más ecológica y con menor uso de agua que usando los agentes actuales, por lo cual su uso tiene un futuro promisorio en la industria alimentaria.

**Palabras clave:** Agua electrolizada, acero inoxidable, electropulido.

## SUMMARY

Stainless steel is one of the most used materials in processing equipment for food industry. Different protocols for the cleaning and disinfection have been developed to guarantee the safety of processed food. Chemical agents (strong alkalis and acids) and sodium hypochlorite are able to remove food waste and microorganisms; nowadays these are being replaced by less dangerous agents. A new system is electrolyzed water (EW) that has demonstrated activity against pathogen and spoilage microorganisms, besides, it eliminates effectively the organic matter on surfaces. The objective of this study was to evaluate a cleaning and disinfection process with alkaline and neutral EW respectively on stainless steel as a model for processing equipment of dairy products. Stainless steel type 304-2B plates were used with and without surface modification. These plates were preconditioned with raw milk, followed by inoculations with a mixture of three microorganisms of approximately  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> each one (*Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Micrococcus luteus*). An experimental design was carried out to evaluate the efficiency of the cleaning process, using three concentrations of alkaline EW, three temperatures and three contact times. After each treatment, disinfection with neutral EW was done. The response variable was the microbial population, determined by the Miles-Misra technique. Statistical analysis showed that time, concentration, modification and the interactions time-superficial modification and temperature-surface modification had statistical significance ( $p < 0.05$ ). A reduction of about 4 log in microbial population was observed. Two sources of neutral EW were compared; a commercial trademark and other one produced by CIDETEQ, and the results showed that there is a similar behavior for both of them regarding disinfection. For the cleaning and disinfection processes of the plates with surface modification, a lower contact time was required, because the surface does not provide a physical protection to contaminants. This innovative system for cleaning-disinfection, using EW is a more ecological alternative and with a lower consumption of water than using actual agents, therefore, its use has a promising future in food industry.

Keywords: Electrolyzed Water, stainless steel, electropolished.

## AGRADECIMIENTOS

- A la **Universidad Autónoma de Querétaro** por darme la oportunidad de seguir con mi desarrollo profesional y por ayudarme a crecer como ser humano
- Al **Programa de Posgrados en Alimentos del Centro de la Republica** por abrirme sus puertas y darme las armas necesarias para enfrentarme a los retos profesionales
- A la **Doctora Blanca** por recibirme en su equipo y por todo el apoyo recibido a lo largo de este proyecto. Su conocimiento y consejos fueron la guía para que este trabajo llegara a buen puerto. Gracias por haber creído en mí
- Al **Doctor Carlos**, al **Doctor Castaño**, a la **Doctora Amaya** y al **Doctor Santos** por sus consejos y observaciones, sin su aporte no hubiera sido posible
- A todos aquellos **Maestros** y **Doctores** que compartieron sus conocimientos y experiencias, ayudando a mi formación
- A la compañía **EcoRus®** por el aporte técnico y los materiales proporcionados
- Al **CONACYT** por el financiamiento otorgado durante la realización del proyecto

## DEDICATORIAS

A la luna por acompañarme en esas caminatas, por ser mi confidente y consejera y por recordarme que en algún lugar hay alguien que me cuida a donde quiera que vaya. Una vez más gracias Mamá Bella

A mis padres por ser la guía de mi vida, por la fuerza que me inyectan y por ser mi sustento, sin ustedes en verdad que no sería nada. Señora Bonita tu siempre me has dado lo mejor de ti, Muñeco de ti viene gran parte de la fuerza que me anima a superarme. Los Amo con todo el Corazón

A mi hermana, amiga y cómplice Magali y a la pequeña Princesa Rebeca, sin ustedes esta vida no sería igual. Gracias por caminar a mi lado, por el apoyo y por siempre creer en mí. Los Amo hartoo hartoo hartoo!!!

A todas mis, Tías, Tíos y Primos, a mi Abuelo y a todos los que ya no están pero que siguen a mi lado. Les agradezco todo el amor y apoyo que me han dado, sin todos ustedes no estaría aquí y no sería lo que soy

A mi roomiiee... que digo roomiiee, mi amigo... que digo amigo, mi hermano... que digo hermano, mi sangre... bueno que digo mi sangre, mi acá!!!! Gracias por demostrarme que no es necesario compartir sangre para ser hermanos!!!

A las que me acompañaron durante esta aventura en todas las buenas y malas y en las idas y vueltas. Adriana, Flor, Ivonne, Martha y Raquel, gracias por permitirme entrar en sus vidas, por no dejar que olvidara mi lado humano y por no permitirme que despellejara a alguien en el camino

A Teresita por permitirme ser su amigo y por alegrar los días en el laboratorio, algún día encontrare como regresarte un poco de todo lo que me diste amiga!!!!

A todos los que dejaron una huella en mi vida durante estos dos años. Aldo, Alejandra, Carmen, Carlos, Cesar, Clara, Claudia, Dianita, Eli Cadena, Eli Girón, Fer, Irais, Isela, Karen, Lilia, Mathy, Rafa, Ray, Vicky, Yajaira, Yesy... espero no olvidar a nadie. Les agradezco por todo lo que me regalaron

En fin, nuevamente a todos aquellos que creyeron en mí y a los que no también!! Esto va por todos ustedes!!!

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	i
<b>SUMMARY</b>	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>DEDICATORIAS</b>	iv
<b>INDICE GENERAL</b>	vi
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	viii
<b>INDICE DE TABLAS</b>	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. REVISIÓN DE LITETARURA</b>	3
<b>2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos</b>	3
<b>2.2. Sistemas de limpieza en la industria de alimentos</b>	5
<b>2.3. Agua electrolizada (AE)</b>	8
<b>2.3.1. Mecanismo de acción del Agua Electrolizada</b>	12
<b>2.4. Limpieza y sanitización de superficies inertes</b>	14
<b>2.5. Formación de biopelículas en el ambiente del procesamiento de alimentos</b>	17
<b>2.6. Tipos de Acero</b>	21
<b>2.6.1. Aceros al carbono</b>	21
<b>2.6.2. Aceros aleados</b>	21
<b>2.6.3. Aceros de baja aleación ultrarresistentes</b>	22
<b>2.6.4. Aceros inoxidable</b>	22
<b>2.7. Adhesión de microorganismos sobre superficies inertes</b>	24
<b>2.8. Recubrimiento de superficies inertes</b>	25
<b>2.9. Pulido de acero</b>	26
<b>2.10. Electropulido</b>	27
<b>2.11. Diseño de experimentos</b>	29
<b>2.11.1. Diseño óptimo de experimentos</b>	30
<b>3. OBJETIVOS</b>	33

<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>34</b>
4.1. Electropulido de placas de acero inoxidable 304-2B	34
4.2. Conservación de microorganismos	34
4.3. Mezcla de microorganismos	35
4.4. Capacidad antimicrobiana del AE neutra	36
4.5. Capacidad de adhesión de la mezcla de microorganismos sobre la superficie de acero	36
4.6. Proceso de lavado y desinfección con AE alcalina y AE neutra	37
4.7. Diseño Óptimo de Experimentos	37
<b>5. RESULTADOS Y ANÁLISIS</b>	<b>40</b>
5.1. Electropulido de placas de acero inoxidable 304-2B	40
5.2. Mezcla de microorganismos	43
5.3. Capacidad antimicrobiana del AE neutra	44
5.4. Capacidad de adhesión de la mezcla de microorganismos sobre la superficie de acero	48
5.5. Diseño experimental óptimo	50
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>62</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>64</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Equipos de electrólisis	<b>10</b>
<b>Figura 2:</b>	Diagrama de cámara electrolítica	<b>11</b>
<b>Figura 3:</b>	Diagrama del proceso de un lavado tipo CIP (Clean in Place)	<b>15</b>
<b>Figura 4:</b>	Estructuras de algunos trihalometanos	<b>16</b>
<b>Figura 5:</b>	Etapas de formación de biopelículas	<b>19</b>
<b>Figura 6:</b>	Diagrama general de una celda electrolítica	<b>28</b>
<b>Figura 7:</b>	Micrografías de la superficie de placas de acero	<b>29</b>
<b>Figura 8:</b>	Placas electropulidas	<b>40</b>
<b>Figura 9:</b>	Micrografía de Fuerza atómica de placas de acero inoxidable	<b>41</b>
<b>Figura 10:</b>	Cajas con cultivo puro	<b>43</b>
<b>Figura 11:</b>	Capacidad antimicrobiana del AE neutra (Desy®) sobre la mezcla de microorganismos a diferentes tiempos	<b>45</b>
<b>Figura 12:</b>	Capacidad bactericida del AE neutra (CIDETEQ) sobre la mezcla de microorganismos a diferentes tiempos	<b>47</b>
<b>Figura 13:</b>	Población microbiana recuperada de las superficies pulida y sin pulir de acero inoxidable preacondicionada con leche cruda	<b>50</b>
<b>Figura 14:</b>	Resultado de los tratamiento y sus replicas	<b>53</b>
<b>Figura 15:</b>	Residuales para cada tratamiento y su replica	<b>53</b>
<b>Figura 16:</b>	Análisis de varianza del diseño óptimo	<b>54</b>
<b>Figura 17:</b>	Efectos significativos del diseño óptimo	<b>54</b>
<b>Figura 18:</b>	Gráficas de superficie respuesta para las placas pulidas	<b>56</b>
<b>Figura 19:</b>	Gráficas de superficie respuesta para las placas electropulidas	<b>58</b>
<b>Figura 20:</b>	Grafica 3D para las placas de acero inoxidable	<b>59</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b>	Características de las fracciones obtenidas de la electrolisis del agua	<b>10</b>
<b>Tabla 2:</b>	Clasificación de los aceros inoxidable empleados en la fabricación de equipos industriales	<b>23</b>
<b>Tabla 3:</b>	Condiciones de cultivo de los microorganismos utilizados	<b>35</b>
<b>Tabla 4:</b>	Diseño del experimento	<b>37</b>
<b>Tabla 5:</b>	Tratamientos del diseño óptimo	<b>38 – 39</b>
<b>Tabla 6:</b>	Actividad antimicrobiana del AE neutra (Desy®) sobre la mezcla de microorganismos a diferentes tiempos de exposición	<b>44</b>
<b>Tabla 7:</b>	Actividad antimicrobiana AE neutra (CIDETEQ) sobre la mezcla de microorganismos a diferentes tiempos de exposición	<b>46 – 47</b>
<b>Tabla 8:</b>	Población microbiana recuperada de la superficie de acero preacondicionado (pruebas preliminares)	<b>48</b>
<b>Tabla 9:</b>	Población microbiana recuperada de la superficie de las placas de acero inoxidable	<b>49</b>
<b>Tabla 10:</b>	Tratamientos del diseño óptimo y variable respuesta	<b>51 – 52</b>
<b>Tabla 11:</b>	Tratamientos confirmatorios para el diseño óptimo	<b>59</b>
<b>Tabla 12:</b>	Tratamientos realizados con el AE neutra del CIDETEQ	<b>60</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

El aseguramiento de la inocuidad de los alimentos es de suma importancia para la industria alimentaria, debido a que los alimentos contaminados pueden ser una fuente de agentes infecciosos, provocando brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) que tienen una alta morbilidad y mortandad a nivel mundial. Los principales agentes infecciosos transmitidos por los alimentos son bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* 0157:H7, entre otras. Además algunos hongos, levaduras, parásitos, metabolitos de estos como toxinas o alérgenos, o algunos compuestos químicos como metales pesados o insecticidas. En otros casos no se puede identificar el agente causante del brote debido a la falta de información por parte de los pacientes o a la falta de muestras de los alimentos posiblemente involucrados.

Los alimentos responsables de un mayor número de brotes de enfermedades destacan el huevo y sus derivados, los productos lácteos y los productos cárnicos. Los factores como un mal manejo de la temperatura, uso de materia prima contaminadas, manipulación inadecuada de los alimentos y una limpieza deficiente de los equipos o utensilios tienen un impacto directo en la inocuidad y se han determinado como factores que contribuyen a la aparición de brotes.

Para limpiar y desinfectar las materias primas, los productos terminados y los equipos se utilizan agentes químicos de naturaleza diversa, la efectividad para remover contaminantes depende del agente. La mayoría de estos agentes tienen riesgos relacionados tanto en su transporte y almacenamiento como en su uso, por ejemplo el cloro, que es muy utilizado, es corrosivo para las superficies e irritante para las mucosas y piel de los usuarios, por lo que se han buscado agentes que cuenten con la misma o mayor efectividad pero que se reduzcan los riesgos y sean más amigables con el medio ambiente.

El agua electrolizada se ha distinguido como un agente con alta efectividad contra microorganismos patógenos y deterioradores presentes en los alimentos, además de que reduce significativamente los riesgos asociados a su manejo y almacenamiento. Para la producción de este agente antimicrobiano es necesaria una solución de cloruro de sodio, una cámara con electrodos (ánodo y cátodo) y una fuente de poder. Durante su producción se generan dos fracciones, la fracción ácida (pH 2.5, Redox >1100 mV, 10-90 mg/L de cloro residual) y la alcalina (pH 11, Redox 750 mV), además en cámaras especiales se da la producción de agua electrolizada neutra y agua electrolizada ligeramente ácida.

Su mecanismo de acción no se ha establecido completamente por ser un sistema combinado, pero se sabe que el ácido hipocloroso, el hipoclorito de sodio, el ozono, los iones hidroxilo, además del potencial de oxidación-reducción actúan de manera combinada y son los principales responsables de su actividad. Además, se ha reportado que las especies electroquímicamente formadas tienen una mayor actividad que aquellas que son químicamente producidas.

Este nuevo sistema de agentes antimicrobianos se ha probado en diversos materiales utilizados en la fabricación de equipos, así como en diferentes alimentos frescos y procesados, logrando una reducción de la microbiota por debajo de los límites de detección y en un menor tiempo de contacto que los agentes tradicionales. La reducción del tiempo de contacto es una ventaja importante del agua electrolizada sobre los otros agentes, ya que reduce el tiempo necesario para la limpieza de los equipos y materiales, lo cual tiene un impacto positivo en la producción.

## 2. REVISIÓN DE LITETARURA

### 2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) son aquellas en las que el agente infeccioso (bacterias, parásitos, virus o sus metabolitos) entra al organismo por medio de un alimento. Estas enfermedades continúan siendo una amenaza a la salud pública en todo el mundo y son una causa importante de morbilidad y mortandad. Aunque la mayoría son leves y se asocian a síntomas gastrointestinales agudos tales como diarrea y vómito, en algunas ocasiones las ETA's son mucho más severa y peligrosa para la salud, especialmente en niños, personas adultas y personas inmunocomprometidas, además las infecciones pueden ocasionar enfermedades crónicas (Al-Haq *et al.* 2005, Huang *et al.* 2008).

Una forma de prevenir estas enfermedades es realizando un control en la calidad microbiológica de las materias primas, hacer una limpieza y desinfección adecuada de las superficies de los equipos previniendo la formación de biopelículas, mantener bajo control el proceso de elaboración, no realizar operaciones que faciliten la contaminación cruzada, implementar sistemas de calidad, como el programa de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), entre otros (Park *et al.* 2004, , Ayebah *et al.* 2005, Japakaset *et al.* 2006, Huang *et al.* 2008).

La inocuidad de los alimentos procesados o frescos debe estar garantizada en cada paso, ya que en cada uno de ellos hay un riesgo de contaminación microbiana que puede causar el deterioro del alimento o puede dar origen a un brote infeccioso. La contaminación cruzada frecuentemente es la culpable de la recontaminación de los productos que ya han pasado por las operaciones encargadas de disminuir o eliminar la microbiota dentro del alimento. Los alimentos que más se relacionan con los brotes de ETA's son los productos lácteos, los alimentos marinos, el huevo y sus derivados, la carne y el pollo, y vegetales mínimamente procesados (alimentos listos para su consumo).

Las superficies inertes de los equipos pueden servir como reservorio de agentes patógenos o deterioradores. Algunos microorganismos pueden tener la capacidad de desarrollar biopelículas, éstos son menos susceptibles a la acción de los agentes desinfectantes, comparación con los microorganismos que se encuentran libres. Esto se debe a que la matriz de sustancias poliméricas extracelulares o biopelícula que forman los mismos microorganismos y les permite protegerse disminuyendo la permeabilidad a los compuestos químicos (Al-Haq *et al.* 2005, Deza *et al.* 2005, Huang *et al.* 2008, Issa-Zacharias *et al.* 2010). En ocasiones, dentro de las plantas de procesamiento, se inicia la formación de biopelículas en superficies que no están en contacto directo con los alimentos como paredes o en el suelo. En estos casos se puede dar una contaminación por la formación de aerosoles cuando las instalaciones (las paredes o el suelo) de la planta son lavadas, estos aerosoles pueden viajar y depositarse en las superficies de los equipos y contaminar los alimentos (Chmielewski *et al.* 2003).

Los productos frescos pueden ser un vehículo de microorganismos patógenos o deterioradores, lo cual representa un peligro a nivel mundial, ya que son consumidos por los beneficios que aportan a la salud, principalmente la mayor biodisponibilidad de los nutrientes y en algunas ocasiones la no utilización de productos químicos como germicidas o fertilizantes (Issa-Zacharias *et al.* 2010). Algunas infecciones gastrointestinales ligadas al consumo de vegetales mínimamente procesados son ocasionadas por contaminación con bacterias enteropatógenas provenientes de las aguas de riego o del personal encargado de la cosecha. El lavado con agua elimina tierra e insectos de la superficie, pero tiene poco efecto sobre aquellos microorganismos que logran internalizarse en los tejidos. Los microorganismos relacionados más frecuentemente con productos frescos son *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *E. coli* enteropatógena (EPEC) y el virus de la Hepatitis A (Deza *et al.* 2003, Issa-Zacharias *et al.* 2011).

Los frutos tienen una vida de anaquel corta debido a la actividad microbiana y al ataque de hongos, el lavado con agua no remueve completamente la carga bacteriana por lo que es necesario el uso de agentes como el hipoclorito de sodio, dióxido de cloro, bisulfito de sodio, dióxido de sulfuro, ácidos orgánicos, entre otros. Si bien el uso de éstos compuestos puede dar mejores resultados, la desventaja es que su uso implica un riesgo a la salud de los operarios y un peligro en su almacenamiento.

## **2.2. Sistemas de limpieza en la industria de alimentos**

Se define como limpieza a la remoción o eliminación de tierra, residuos de alimentos, suciedad, grasa u otras materias no deseables de los alimentos o superficies, el término de limpieza es muy amplio ya que no es un tratamiento sobre la población de microorganismos presentes. Otro término más específico es el de desinfección, el cual se define como la reducción del número de microorganismos (bacterias patógenas o deterioradoras, virus o parásitos) presentes en el medio ambiente, por medio del uso de agentes químicos y/o métodos físicos, a un nivel que no comprometa la inocuidad de los alimentos. En conjunto estas dos acciones aseguran la calidad e inocuidad de los alimentos, es decir que se garantiza que los alimentos no causaran daño al consumidor cuando se preparan y/o cuando se consuman de acuerdo con el uso a que se destinan (Walker *et al.* 2005a, OMS 2009). Los criterios que se toman en cuenta para considerar una limpieza efectiva son la concentración del agente sanitizante, el tiempo de contacto con la superficie o el producto, la temperatura de aplicación y la acción mecánica o física, es decir el tallado, lavado manual o la presión utilizada durante el lavado (Jasso 2008).

La naturaleza de la suciedad en la industria alimentaria es de una naturaleza variada, es decir, puede ser orgánica (carbohidratos, proteínas, grasas o compuestos derivados de hidrocarburos) o inorgánica (sales, piedras, tierra o metales, tanto iones disueltos como piezas metálicas de los equipos). La presencia de esta suciedad puede favorecer el desarrollo de microorganismos y la

formación de biopelículas sobre las superficies contaminadas, por otro lado la adhesión de los depósitos de sales, proteínas o grasa, sobre las superficies se ven favorecidos por la energía libre y por las interacciones hidrofílicas o hidrofóbicas de los materiales (Zhao *et al.* 2005b).

Se han utilizado una enorme cantidad de compuestos químicos, físicos y biológicos para limpiar y desinfectar desde las materias primas hasta los productos terminados, pasando por los equipos y utensilios. A estos compuestos se les denomina sanitizantes y se definen como un agente capaz de reducir los microorganismos de una superficie, su eficiencia debe ser del 99.9% de reducción de microorganismos de prueba en un tiempo de contacto de 30 segundos. Estos compuestos deben resistir el pH, no deben ser tóxicos ni irritantes, deben tener buena solubilidad, deben ser estables concentrados o diluidos, deben ser fáciles de aplicar y con una alta efectividad, además de baratos (Ayebah *et al.* 2006, Jasso 2008).

Los sanitizantes se clasifican en 6 grupos: 1) halógenos; 2) ácidos aniónicos; 3) sales cuaternarias de amonio; 4) ácido peracético; 5) anfotéricos; 6) otros. Dentro de los halógenos están las especies cloradas (hipoclorito de sodio, ácido hipocloroso, cloro gas) y los compuestos iodados y las mezclas como iodo-cloro y iodo-bromo. Los ácidos aniónicos son una combinación de surfactantes aniónicos y ácidos generalmente a pH menores de 3. Las sales cuaternarias de amonio, como el cloruro de benzalconio, son utilizados para la sanitización ambiental (pisos, drenajes, techos, etc.). El ácido peracético es producido por la reacción entre el ácido acético y el peróxido de hidrogeno, pese a su olor desagradable es de alta eficiencia y de segura biodegradabilidad. Los anfotéricos son surfactantes con amplio espectro biocida, aunque el pH en el cual es efectivo es neutro. Dentro de los otros sanitizantes se encuentran el ozono, la luz ultravioleta, dióxido de cloro, extractos naturales, entre otros (Ayebah *et al.* 2006, Jasso 2008).

Estos compuestos tienen un amplio espectro contra bacterias, hongos y levaduras, cada uno con un mecanismo de acción diferente. El mecanismo de acción, por lo general dependerá del tipo de microorganismos presentes y de la estructura química del mismo, este mecanismo de acción está basado en reacciones de oxido-reducción, ya que la efectividad del desinfectante está relacionada con la capacidad de oxidar los grupos funcionales presentes en las membranas o paredes celulares (EPA 1999). Para algunos ha sido muy estudiado dicho mecanismo y para otros no está del todo claro, ya que participan varios compuestos, es decir el agente es un sistema que debe su poder antimicrobiano a la acción combinada de 2 o más compuestos, un ejemplo de estos agentes es el agua electrolizada donde tienen participación el elevado potencial Redox y las especies químicas activadas electroquímicamente (Park *et al.* 2004, Deza *et al.* 2005, Japakaset *et al.* 2006). Algunos compuestos o métodos utilizados tradicionalmente son hidróxido de sodio, hipoclorito de sodio, fosfato trisódico, cloruro de cetilpiridínio, formaldehído, glutaraldehído, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, irradiación, ácidos orgánicos o minerales, enfriamiento rápido, congelación, procesamiento a altas presiones, shocks térmicos, entre otros (Deza *et al.* 2003, Al-Haq *et al.* 2005, Ren *et al.* 2006). La efectividad de estos compuestos ó procesos depende de la presencia de sólidos, dureza del agua utilizada, la temperatura de aplicación y del tiempo de contacto (Chmielewski *et al.* 2003).

Como agentes químicos de desinfección las soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) es uno de los más utilizados, generalmente en una concentración de 50 a 200 mg de cloro/L, a esta concentración la efectividad es baja, si se aumenta esta concentración, la eficiencia también aumenta pero se podrían formar depósitos de sodio en la superficie del alimento. Por otro lado, el cloro es muy reactivo en presencia de materia orgánica, ya que tiene una alta atracción por los enlaces insaturados, por los compuestos nucleófilos (compuestos que donan fácilmente un par de electrones) y por los agentes reductores, formándose compuestos volátiles (aldehídos, clorofenoles), compuestos tóxicos (trihalometanos) o compuestos carcinogénicos (organohalógenos). La formación

de estos compuestos peligrosos depende del pH y del tiempo de contacto de la especie clorada y la materia orgánica (EPA 1999, Ayebah *et al.* 2006, Issa-Zacharias *et al.* 2011).

El modo de uso de cualquiera de estos agentes implica un tiempo de contacto o exposición lo cual podría generar problemas, ya que se facilita la formación de depósitos en la superficie de los productos, provoca cambio en las propiedades sensoriales. Además, a nivel de superficies de equipos y utensilios puede haber daños como corrosión. Aunado a esto, algunos de ellos se han dejado de utilizar por sus elevados costos y los riesgos que asociados a su uso, al transporte y al almacenamiento. Por esto es importante el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos que reduzcan los riesgos asociados pero de igual o mayor, así como el establecimiento de Buenas Prácticas de manufactura en el ambiente del procesamiento de alimentos (Deza *et al.* 2003, Al-Haq *et al.* 2005).

### **2.3. Agua electrolizada (AE)**

El AE es un sistema de limpieza y sanitización que muestra una alta actividad antimicrobiana tanto en productos frescos como en superficies de materiales utilizados en la fabricación de equipos para la industria alimentaria (Walker *et al.* 2005, Issa-Zacharias *et al.* 2011, Mukhopadhyay *et al.* 2012).

La tecnología del uso de AE se utilizó por primera vez en la industria de alimentos en la primer década del siglo XX por Japan Soda Industry Association una industria refresquera, aunque fue comercial hasta la década de los 80's. A través de los años los equipos han sufrido cambios importantes, principalmente enfocados en disminuir el tamaño y aumentar la eficiencia (Al-Haq *et al.* 2005, Mukhopadhyay *et al.* 2012). Para la producción del agua electrolizada sólo se necesita agua potable, cloruro de sodio y el equipo, el cual ya se encuentra disponible con cierta facilidad.

Generalmente el equipo consta de una cámara dividida en dos por una membrana o diafragma, que separa los electrodos, una fuente de poder y bombas dosificadoras para la solución de cloruro de sodio y agua. Algunos equipos ofrecen la posibilidad de retirar la membrana o ajustar el pH permitiendo el intercambio de iones a través de la membrana, con lo que se produce el agua neutra con características diferentes (Figura 1 y 2, Tabla 1). Mediante la membrana se producen dos tipos de agua electrolizada con diferentes características, la fracción ácida recolectada en el cátodo y la fracción alcalina recolectada en el ánodo. En la literatura hay varias formas de referirse a estas fracciones, para la fracción ácida se utilizan los términos agua electrolizada ácida o agua electro-oxidada, para la fracción alcalina se utilizan los términos agua electrolizada alcalina o agua electro-reducida. Si se da una mezcla dentro del equipo de las anteriores aguas se produce el agua electrolizada neutra o agua oxidada neutra (Al-Haq *et al.* 2005).

Electroquímicamente se producen especies activas de cloro ( $\text{Cl}_2$  gas, HOCl,  $\text{OCl}^-$ ,  $\text{ClO}_2$ ) y de oxígeno ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{O}_2^*$ ,  $\text{HO}_2$ ) y se da un aumento en el potencial de oxido-reducción (Redox) por arriba de 1000 mV. Las especies electroquímicamente activadas tienen un 400% más de efectividad que las producidas químicamente. Estos factores (las especies activas y el Redox) se han relacionado con una fuerte actividad antimicrobiana (Park *et al.* 2004, Issa-Japakaset *et al.* 2006, Zacharias *et al.* 2010, Aider *et al.* 2012). Durante la electrolisis de la solución salina se forma el dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ), el cual puede reaccionar con las moléculas de agua formando más iones hipoclorito, además de iones clorato e iones clorito. El nivel de dióxido de cloro debe ser vigilado ya que para algunos países este está establecido en las normas oficiales (EPA 1999)

**Tabla 1:** Características de las fracciones obtenidas de la electrolisis del agua

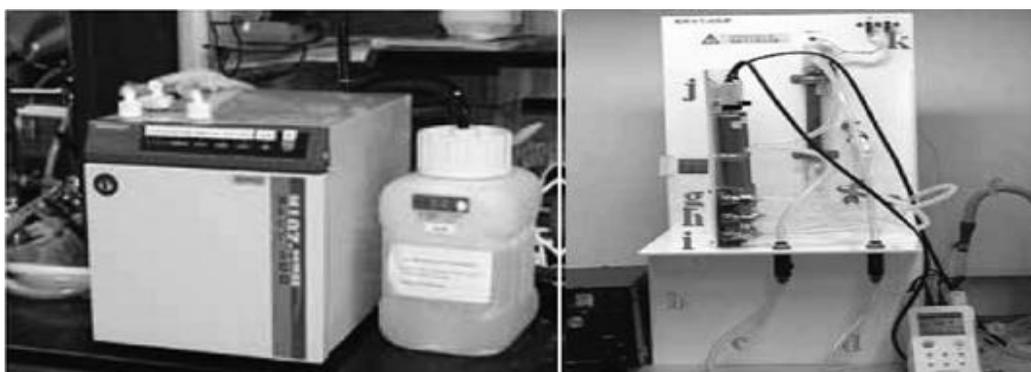
Fracción	pH	Redox (mV)	Cloro residual (ppm)
Ácida <sup>1</sup>	2.5	>1100	10-90
Alcalina <sup>2</sup>	11.5-12.5	-750	NA
Neutra <sup>3</sup>	6.2-7.3	800-1000	500

<sup>1</sup> Huang *et al.*, 2008.

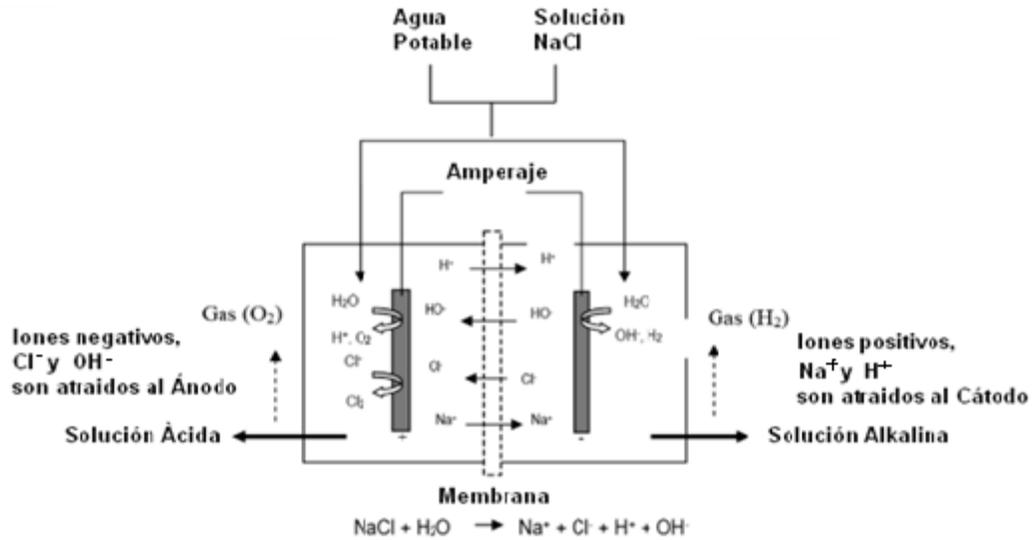
<sup>2</sup> Hoja técnica A. A. LIMY, Ecorus.

<sup>3</sup> Hoja técnica A. A. DESY®. Ecorus.

Se ha mostrado que el agua electrolizada tiene un fuerte efecto bactericida contra la mayoría de las bacterias patógenas y deterioradoras, además de hongos y levaduras, en investigaciones alrededor del mundo, principalmente en Japón y Estados Unidos (Al-Haq *et al.* 2005). Se han reportado el uso de agua electrolizada contra microorganismos endógenos e inoculados intencionalmente en frutas, legumbres, en forma libre o en la formación de biopelículas, así como en superficies como el acero inoxidable, vidrio, plástico, caucho, entre otros (Deza *et al.* 2003, Walker *et al.* 2005a, Japakaset *et al.* 2006, Abdulsudi *et al.* 2010).



**Figura 1:** Equipos de electrólisis (Al-Haq *et al.* 2005, Huang *et al.* 2008)



**Figura 2:** Diagrama de cámara electrolítica

El AE alcalina no presenta una actividad bactericida significativa, su principal actividad es saponificando las grasas y las proteínas, además desestabiliza o disuelve las sustancias poliméricas extracelulares por lo que se facilita la difusión de los desinfectantes. En general si el AE alcalina se utiliza antes de un desinfectante aumenta la eficiencia de este, debido a la actividad del AE alcalina sobre la materia orgánica (Ayebah *et al.* 2005, Ayebah *et al.* 2006)

Los factores que afectan esta actividad antimicrobiana del agua electrolizada son el almacenamiento prolongado, debido a la evaporación del cloro gas y la descomposición del HOCl; la exposición a la luz; la agitación durante el tratamiento; el pH del medio debido a que la solubilidad del cloro depende de este parámetro (Al-Haq *et al.* 2005, Huang *et al.* 2008). La materia orgánica presente puede inactivar al cloro, esto tiene doble aplicación, por un lado si durante el almacenamiento tiene contacto con materia orgánica pierde efectividad cuando sea utilizada, por otro lado después de utilizar el agua electrolizada, por la materia orgánica pierde su funcionalidad y regresa a ser agua común (Ayebah *et al.* 2006, Issa-Zacharias *et al.* 2010). Por estos factores adversos a la actividad microbiana es conveniente que se genere el AE inmediatamente antes de utilizarla.

El gasto inicial es otro de los inconvenientes, aunque los ahorros producidos por esta tecnología recuperan rápidamente el gasto inicial. Las principales ventajas de este agente microbiano, como son la reducción de los riesgos tanto durante el almacenamiento como los asociados a la salud de los operarios; reduce el tiempo de contacto y no deja residuos peligrosos; al contacto con el agua del grifo el AE pierde actividad; en comparación con las soluciones de cloro o sosa, este nuevo sistema no produce deterioro en las superficies, como corrosión o degradación de resinas.

La mayor ventaja del AE es debido a las bajas concentración de cloro utilizadas y residual, su inactivación cuando es diluida con agua corriente, por lo que se considera un sistema de agentes antimicrobianos amigable con el ambiente (Liao *et al.* 2007, Aider *et al.* 2012).

### **2.3.1. Mecanismo de acción del Agua Electrolizada**

El mecanismo de acción de los diversos componentes, tanto de la parte ácida ( $\text{Cl}_2$ ,  $\text{HOCl}$ ,  $\text{OCl}^-$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), como de la parte alcalina ( $\text{NaOH}$ ,  $\text{OH}^-$ ), actúan como un sistema combinado. Aunado a estos componentes se tiene un alto valor de potencial Redox (Al-Haq *et al.* 2005). Existe una controversia sobre cuál es el componente con mayor actividad antimicrobiana, hay autores que sostienen que las especies activadas electroquímicamente y el pH son las responsables de la actividad, mientras que otros argumentan que el valor del potencial Redox es el agente con mayor actividad. También hay una corriente de investigadores que afirman que no se puede separar una actividad de otra, ya que el potencial Redox provoca daños a las membranas, debido a que el oxígeno toma electrones de las moléculas, con esto se pierde la estabilidad de la membrana y se da la formación de poros y la consecuente salida del componente celular, al mismo tiempo el pH facilita la entrada del  $\text{HOCl}$ , que es la especie clorada con mayor actividad, ya que inhibe la oxidación de la glucosa. Por otro lado un potencial Redox diferente al de las células, ocasiona modificaciones del metabolismo, así como el gasto del ATP

para restablecer la integridad de las células (Huang *et al.* 2008, Issa-Zacharias *et al.* 2011, Mukhopadhyay *et al.* 2012).

A un pH de 7 y a 15°C el ácido hipocloroso representa el 97%, según la Ley de Nernst, a un pH mayor aumenta la concentración de  $\text{OCl}^-$  que es menos oxidante y con menor actividad. El potencial Redox disminuye al aumentar el pH, es decir que el poder oxido-reductor aumenta cuando más aumenta el cloro residual, lo que indica que esta especie es la responsable del poder oxidante (EPA 1999, Park *et al.* 2004, Japakaset *et al.* 2006).

El cloro oxida los grupos sulfidrilos de las enzimas importantes en el metabolismo de los carbohidratos. Otras actividades atribuidas al cloro son: interrumpir la síntesis de las proteínas; oxida los grupos amino y carboxilo de los aminoácidos a nitritos y aldehídos respectivamente; reacciona con los ácidos nucleicos, daña el material genético; inhibe la captación de oxígeno e interrumpe la fosforilación oxidativa; forma derivados tóxicos N-clorados de la citosina; entre otras (Park *et al.* 2004, Japakaset *et al.* 2006, Huang *et al.* 2008, Aider *et al.* 2012).

Las especies activas de oxígeno como el ozono o el peróxido de hidrógeno también tienen actividad, ya que generan radicales libres y desencadenan señales que provocan la muerte celular (Liao *et al.* 2007, Huang *et al.* 2008). La capacidad oxidante del oxígeno depende fuertemente del pH, ya que a pH neutro o ligeramente alcalino la reacción es más rápida. Por otro lado el ozono puede actuar por dos vías, una implica una oxidación directa de la materia orgánica y la otra es por la formación de radicales hidroxilos, los cuales al ser más oxidantes que el propio ozono reaccionan de forma más rápida con la materia orgánica, la vía por la cual reacciona el ozono dependerá de las condiciones del medio (EPA 1999).

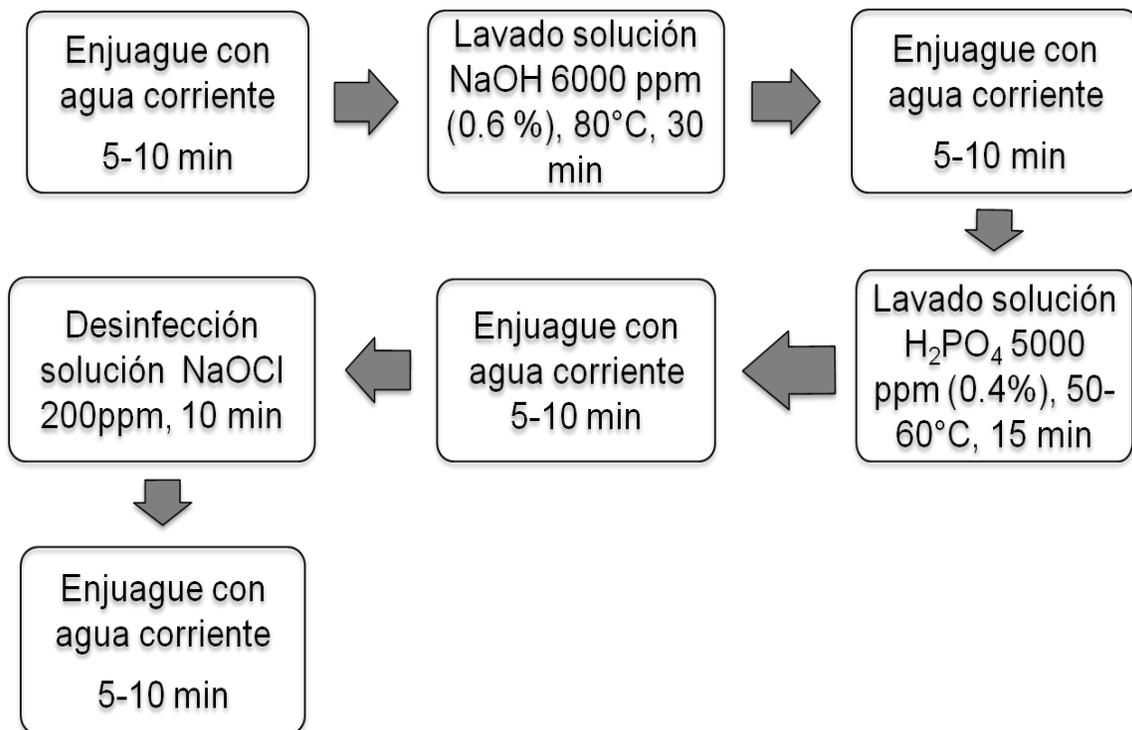
El rango de potencial Redox en el que crecen las bacterias va desde 200 a 800 mV para las aerobias y de 200 a 400 mV para las anaerobias. Este rango de

potencial de oxido-reducción contribuye al control del ambiente celular, a la diferenciación, al crecimiento, a la muerte y adaptación. A lo largo de los procesos fisiológicos y patológicos esta potencial va cambiando (Liao *et al.* 2007). El potencial Redox de la fracción ácida es mayor a 800 mV, que es superior al máximo que soportan las bacterias, esto ayuda a entender el poder antimicrobiano de esta fracción, debido a que una ligera elevación del potencial de oxidación desencadena señales de apoptosis o necrosis si el cambio es severo. Estas señales son desencadenadas por el alto gasto de energía para contrarrestar el ambiente oxidante y porque es dañada la maquinaria encargada de la producción de ATP's. Otra de las modificaciones causada por el estrés oxidativo es la formación de puentes disulfuro en residuos diferentes a los normales en las proteínas, con lo que se pierde la estructura y la actividad (Park *et al.* 2004, Liao *et al.* 2007).

#### **2.4. Limpieza y sanitización de superficies inertes**

Como se ha mencionado la limpieza y la desinfección de las superficies con las cuales tiene contacto el alimento es un punto importante que se debe atender para evitar una contaminación cruzada o recurrente. En la industria de productos lácteos se emplea generalmente un sistema llamado CIP (Clean In Place) (Figura 3) que consta de 4 etapas, las cuales son: 1) enjuague con agua caliente; 2) lavado con una solución altamente alcalina (NaOH, KOH o polifosfatos, al 5%); 3) lavado con solución ácida (ácido sulfúrico o fosfórico, al 6%); y 4) aplicación solución sanitizante. De manera general se sanitiza con una solución de 200 a 400 ppm de NaOCl (Latorre *et al.* 2010). Se consideran enjuagues con agua entre etapas. Mediante el agua caliente se remueven los residuos de alimentos; la solución alcalina se encarga de remover depósitos de grasa y proteínas adheridos a la superficie; la solución ácida neutraliza el álcali del lavado anterior, disuelve minerales y deja un ambiente oxidante que retarda el desarrollo microbiano; y la solución sanitizante retira los microorganismos que no están fuertemente unidos a la superficie (Chmielewski *et al.* 2003, Walker *et al.* 2005a y 2005b).

Cuando la estructura o conformación de las superficies, es más porosa o rugosa es necesario llevar cabo un procedimiento de limpieza con mayor fuerza tal vez utilizando agentes químicos con mayores concentraciones, temperatura o tiempo de contacto. Estos parámetros son importantes cuando se hace un tratamiento de limpieza, ya que la combinación adecuada combinación de estos parámetros determina la eficiencia del procedimiento. En general a una mayor temperatura y concentración el tiempo de contacto debe ser menor.



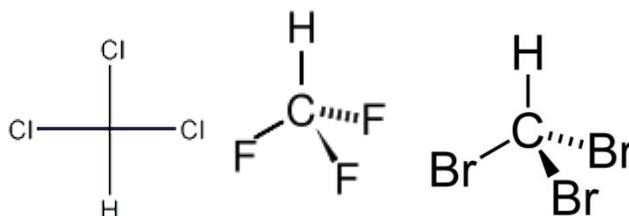
Walker *et al.* 2005

**Figura 3:** Diagrama del proceso de un lavado tipo CIP (Clean in Place)

Las soluciones alcalinas contienen una alta concentración de iones hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ), por lo que estas soluciones son altamente caústicas y pueden provocar daños a la piel o a los ojos de los usuarios u operarios, por otro lado las soluciones cloradas desprenden cloro en forma de gas. Es por esto que se están dejando de utilizar para la limpieza y sanitización de equipos. Al trabajar con soluciones cloradas existe el riesgo de que estas especies cloradas reaccionen

con la materia orgánica formando compuestos altamente cancerígenos, estos compuestos son denominados trihalometanos, como ya se había mencionado.

Los trihalometanos (THM's) (Figura 4) son generados por la sustitución de tres átomos de hidrogeno por igual número de átomos de algún halógeno, la presencia de cloro residual (cloro gas, ion hipoclorito, ácido hipocloroso) en las soluciones de sanitización, altas temperaturas sostenidas por largos tiempos, la presencia de precursores orgánicos, concentración del bromo en el agua utilizada, además del tiempo de contacto son factores que favorecen la formación de estos compuestos tóxicos. La presencia de dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) evita la formación de trihalometanos, ya que este compuesto oxida rápidamente la materia orgánica evitando que esta reaccione con los compuestos clorados (Bove *et al.* 2002).



**Figura 4:** Estructuras de algunos trihalometanos

Walker y colaboradores (2005b), reemplazaron las soluciones normalmente utilizadas con agua electrolizada alcalina y ácida, utilizaron un equipo japonés de Electric Co. Ltd., modelo ROX15SA, en el procedimiento de lavado CIP en un planta de ordeña, encontrando que este nuevo procedimiento muestra resultados similares a los mostrados por el método original con soluciones de NaOH y ácidos minerales. Las condiciones que mejores resultados obtuvieron fueron 10 minutos de contacto a una temperatura de 60°C para ambos lavados. El AE ácida tenía aproximadamente 50 ppm de cloro residual total. Estos investigadores demostraron que el reemplazar los agentes químicos por AE es una buena forma de reducir los riesgos relacionados con el uso de agentes químicos tóxicos y reducir los costos, además de tener un procedimiento más amigable con el ambiente.

Este nuevo sistema de agentes antimicrobianos se ha utilizado en la limpieza y desinfección de superficies, así como en diversos productos alimenticios como peces, aves, frutas y vegetales, logrando una reducción de la microbiota reto por debajo del límite de detección. Los microorganismos reto han sido bacterias patógenas como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp.*, entre otras, así como bacterias propias del alimento, logrando una reducción de la microbiota total de la misma magnitud que los tratamientos tradicionales e incluso mayores. Lo que es importante resaltar es que en todos los tratamientos se tiene una reducción del tiempo de contacto para lograr una considerable reducción microbiana (Park *et al.* 2002, Deza *et al.* 2005, Issa-Zacharias *et al.* 2010, Abdulsudi *et al.* 2010).

Algunas partes de los equipos pueden ser poco accesibles y tener poco contacto con los agentes utilizados en la limpieza, por lo que la remoción de sólidos y la destrucción de los microorganismos se dan con menor eficiencia. Este factor podría favorecer la formación de biopelículas y la supervivencia de los microorganismos a los subsecuentes lavados (Chmielewski *et al.* 2003).

## **2.5. Formación de biopelículas en el ambiente del procesamiento de alimentos**

La formación de biopelículas es una adaptación de las células procariotas, representando una forma de sobrevivir en ambientes hostiles y de colonizar nuevos nichos (Hall *et al.* 2009). Un gran número de microorganismos tiene la capacidad de formar biopelículas, la mayoría de las bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos están asociadas a la formación de biopelículas.

Se define una biopelícula como una comunidad microbiana adherida a una superficie, rodeada de una sustancia polimérica extracelular de diversas naturalezas y longitudes, llamada matriz (Hall *et al.* 2009). Los componentes del material polimérico en el que están embebidos está compuesto por una mezcla de polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos teicóicos y nucleicos, y otras

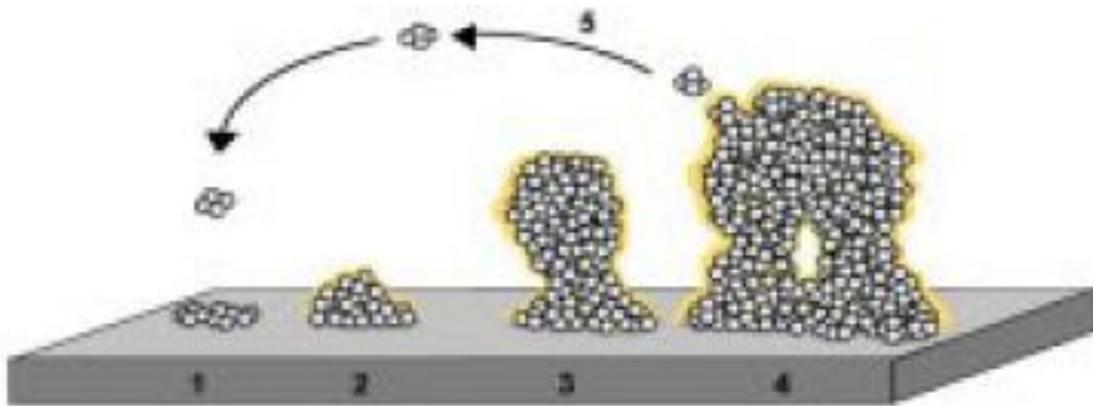
sustancias poliméricas, lo que le permite tener una humedad relativa de entre 85 y 95% (Chmielewski *et al.* 2003). Esta matriz tridimensional da protección a la comunidad bacteriana contra la respuesta inmunitaria del huésped, el tratamiento con antibióticos, los agentes antimicrobianos, las condiciones adversas del medio ambiente como sequia, altas temperaturas o presiones altas, además de que puede servir como fuente de alimento para las bacterias (Aider *et al.* 2012)

La prevención del establecimiento de biopelículas en superficies es un punto crucial para el cumplimiento de la seguridad y asegurar un producto de buena calidad, cuando se ha establecido la biopelículas se da una contaminación constante e indefinida de los productos y su remoción es complicada. Un factor que favorece el establecimiento es una limpieza inadecuada de los equipos, ya que se van acumulando residuos de materia orgánica dando las condiciones apropiadas para el desarrollo de las bacterias (Latorre *et al.* 2010).

Se ha demostrado que el tipo de alimento procesado y el del material con el que está hecho el equipo, además de la topología de la superficie, son factores importantes en la formación y en la posterior eliminación de las biopelículas. Cuando las superficie del material presenta defectos o ralladuras son más difíciles de limpiar en comparación con aquellas que son lisas, si a los defectos se unen algunas características, como las cargas electroestáticas o fuerzas de van der Waals, propias de los materiales o el preacondicionamiento con materia orgánica la adhesión de las bacterias se ve facilitada.

La formación de las biopelículas consta de varias fases, las cuales son: 1) ataque inicial o adhesión; 2) formación de microcolonias y sustancias poliméricas; y 3) maduración de la biopelícula (Figura 5). Después de que ha madurado se puede presentar un desprendimiento de pequeñas fracciones de esta (esta podría considerarse como la fase 4 de la formación de las biopelículas), con lo que se favorece la colonización de nuevos nichos (fase 5). El factor que favorece este desprendimiento es el bajo nivel de fuentes de carbono en el microambiente, lo

que aumenta la producción de sustancias poliméricas extracelulares y consecuentemente el crecimiento de la matriz. En aquellos lugares con una abundante fuente de carbono se favorecerá la adhesión de las fracciones desprendidas, esto es importante ya que si se realiza un lavado inadecuado y hay sobrevivencia de microorganismos o la biopelícula se encuentra en zonas poco accesibles del equipo se puede dar una recontaminación del equipo (Chmielewski *et al.* 2003).



**Figura 5:** Etapas de formación de biopelículas: 1) Fijación; 2) Desarrollo; 3) Maduración; 4) Desprendimiento; y 5) Colonización en otro nicho.

El ataque inicial o adhesión se divide en dos fases, la fase reversible y la no reversible. La primera son los primeros 5 a 30 segundos en los que se da la fijación de las células a la superficie. Dicha adhesión puede ser pasiva, por gravedad o dinámica de los fluidos; o activa, por flagelos, pilis, cargas electroestáticas, fuerzas de van der Waals, formación de capsula bacteriana, entre otras. La fase irreversible comienza con la producción de los polímeros extracelulares, lo cual puede tomar desde 20 minutos hasta 4 horas máximo, esto depende de cada bacteria y de su metabolismo.

La formación de microcolonias, segunda fase de la formación de biopelículas, resulta de la agregación y del crecimiento de las bacterias, acompañados por la formación de los materiales que componen la matriz

extracelular. Cuando dos o más bacterias con la capacidad de formar biopelículas se unen la matriz tiene una composición más compleja, por lo que la matriz es más estable contra las condiciones ambientales adversas.

Los genes responsables de la expresión y regulación de las vías de producción de los compuestos responsables de la adhesión y formación del material polimérico extracelular se encienden bajo el estímulo externo de estrés ambiental (presión osmótica, pH, temperatura, falta de nutrientes, entre otros) o densidad de la población (Chmielewski *et al.* 2003).

Latorre y colaboradores en 2010, recolectaron en 4 ocasiones diferentes (entre mayo del 2007 a marzo del 2008) muestras de un equipo de ordeña (tanque, tuberías y filtros) y del suelo en una planta procesadora de lácteos, encontraron 15 cepas de *L. monocytogenes* las cuales fueron encontradas en los tres primeros muestreos, aun después de hacer lavados de los equipos y de la planta. Por medio de microscopia electrónica de barrido observaron la presencia de biopelículas en las irregularidades de las superficies. Se tienen reportes indicando la presencia de biopelículas por largos periodos, incluso por años.

Se ha reportado la presencia de biopelículas en acero inoxidable, vidrio, plástico, caucho, entre otros, algunas de las cuales son muy utilizados en la fabricación de equipos para la industria alimentaria. Las consecuencias de la presencia de biopelículas en plantas de procesamiento de alimentos es que una contaminación continúa de los productos reduce la vida de anaquel, puede ocasionar una reducción en la transferencia de calor, además ciertas bacterias podrían generar reacciones de corrosión en las superficies, entre otras (Chmielewski *et al.* 2003). Por otro lado la presencia de obstrucciones (bioensuciamiento o incrustaciones) en las tuberías provoca una caída en la presión considerable, por lo que es necesaria mayor potencia en el bombeo (Zhao *et al.* 2005a).

## **2.6. Tipos de Acero**

El acero es una aleación metálica, los componentes principales son: el hierro (98%) y el carbono que puede ir desde un 0.1 a 2% dependiendo del tipo de acero que sea, debido a que con la adición de otros metales se le dan características diferentes a este material y las propiedades fisicoquímicas pueden ser mejoradas. Estos otros elementos pueden ser el cromo, níquel, aluminio, cobalto, molibdeno, entre otros, todos aportan una característica diferente, incluso se realizan aleaciones con más de dos metales buscando el mejoramiento del acero.

Para realizar una clasificación de los diferentes tipos de acero se utilizan los elementos de la aleación y la proporción en la que están presentes, una de las clasificaciones divide a los tipos de acero en: al carbón, aleados, de baja aleación ultrarresistente e inoxidable.

### **2.6.1. Aceros al carbono**

Estos aceros tienen una cantidad variable de carbono, además de manganeso, silicio y cobre. Entre los productos fabricados con este acero están maquinaria, carrocerías de automóviles, piezas para la construcción, cascos de buques, entre otras. Estos aceros presentan una alta resistencia mecánica y a la tracción.

### **2.6.2. Aceros aleados**

Este tipo de acero se puede dividir a su vez en estructurales y especiales, según los elementos metálicos de la aleación. Entre los principales componentes están el vanadio, molibdeno, estos en bajas proporciones, y el manganeso, silicio y cobre, en mayor cantidad.

Los usos de estos aceros es principalmente en partes de maquinarias (engranes, flechas, palancas, etc.), herramientas de corte y moldeo, entre otros.

Las características a resaltar son su alta resistencia a las altas temperaturas y a la corrosión.

### **2.6.3. Aceros de baja aleación ultrarresistentes**

Debido a la concentración alta de carbono y por ende baja de otros elementos esta familia de aceros es la más resistente, en comparación con las otras, es por su alta resistencia que las piezas fabricadas pueden ser más delgadas sin afectar con esto su resistencia.

### **2.6.4. Aceros inoxidables**

Esta familia de aceros contiene cromo, níquel y molibdeno dentro de la aleación, por lo cual tienen una gran resistencia a la oxidación, ya que el cromo que contiene reacciona con el oxígeno formando una capa pasivada, la cual protege a los átomos de hierro de la interacción con el oxígeno. Además gracias a esta combinación de metales el acero inoxidable tiene alta resistencia al trabajo mecánico, a las altas temperaturas por tiempos largos, a la corrosión y oxidación por la humedad, los ácidos y algunos gases resultantes del proceso de fabricación.

Debido a su resistencia este es el material más utilizado en la fabricación de equipos y utensilios en las industrias alimenticias y farmacéuticas. Otra de las características a resaltar es que son higiénicos y de fácil limpieza. Por la amplia variedad de elementos de la aleación el acero inoxidable tiene una clasificación particular, dada precisamente por los metales aleados (Tabla 2).

El metal más importante dentro de la aleación es el cromo, debido a que es el metal que le confiere la resistencia a la oxidación y a la corrosión, esto es porque al reaccionar con el oxígeno ambiental produce una capa pasiva que aísla los átomos de hierro altamente reactivos. Esta capa puede ser afectada por la presencia de ácidos producidos por los productos o por la adhesión de microorganismos sobre la superficie.

**Tabla 2:** Clasificación de los aceros inoxidables empleados en la fabricación de equipos industriales

<b>Grado</b>	<b>304</b>	<b>304L</b>	<b>316</b>	<b>316L</b>	<b>317</b>	<b>400</b>	<b>825</b>	<b>C-276</b>
<b>Carbono</b>	0.08	0.035	0.08	0.035	0.08	0.03	0.05	0.03
<b>Manganeso</b>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00
<b>Fosforo</b>	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	---	---	0.03
<b>Azufre</b>	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.024	0.03	0.02
<b>Silicio</b>	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.50	0.50	1.00
<b>Cromo</b>	18.0 a 20.0	18.0 a 20.0	16.0 a 18.0	16.0 a 18.0	18.0 a 20.0	---	19.5 a 23.5	21.0 a 23.0
<b>Níquel</b>	8.0 a 11.0	8.0 a 13.0	10.0 a 14.0	10.0 a 15.0	11.0 a 14.0	63.0 a 70.0	38.0 a 46.0	4.5 a 6.5
<b>Molibdeno</b>	---	---	2.0 a 3.0	2.0 a 3.0	3.0 a 4.0	---	2.5 a 3.5	2.5 a 3.5
<b>Otros elementos</b>	---	---	---	---	---	Cu Fe	Fe Cu Al, Ti	N

Composición química en %, el restante pertenece de hierro

El acero inoxidable se puede clasificar dependiendo de los metales presentes en la aleación y de la interacción que tengan, además de la forma de los cristales formados en la matriz, las familias principales son:

- Austenítico, formado por hierro, cromo, níquel y carbono
- Ferrítico, formado por hierro, cromo y carbono
- Martensítico, formado por hierro, cromo y carbono, la diferencia con el anterior es que en este último la proporción de carbono es mayor
- Dúplex, formado por hierro, cromo y níquel, la forma cristalina es una combinación entre la presentada en la familia del acero austenítico y el ferrítico, llamada austenoferrita.

## **2.7. Adhesión de microorganismos sobre superficies inertes**

Debido a las características electroestáticas, así como la fuerzas de van der Waals y las interacciones ácido-base de la superficie del acero inoxidable se puede favorecer la adhesión de los microorganismos sobre la misma y la posterior formación de biopelículas. Las características de las membranas celulares o de la pared celular de cada microorganismo también influirán en este proceso, es decir, si las cargas superficiales son afines a las de la superficie se favorecerá el establecimiento sobre la superficie (Andrade *et al.* 2010). Las fuerzas de atracción y de repulsión están implicadas en la adhesión de las bacterias a las superficies. Estos incluyen fuerzas de van der Waals a una distancia de 50 nm y las fuerzas electrostáticas a una distancia de 20 nm entre la superficie y los microorganismos; en este punto se adhieren reversiblemente a una superficie. A una distancia de 1,5 nm, los enlaces iónicos y las fuerzas hidrófobas están presentes. En la transición de la unión reversible a la unión irreversible, diversas fuerzas de corto alcance están involucradas, incluyendo los enlaces covalentes y puentes de hidrógeno, así como las interacciones hidrofóbicas (Rosmaninho *et al.* 2007). Las bacterias se mueven hacia una superficie a través de los efectos de las fuerzas físicas, tales como el movimiento browniano, las interacciones de van der Waals, las fuerzas gravitatorias, la carga electrostática, y las interacciones hidrofóbicas. Las bacterias son atraídas por las fuerzas de largo alcance hasta que las de corto son las que predominan (Andrade *et al.* 2010).

Varios estudios han demostrado la importancia de la hidrofobicidad de superficie en el proceso de adhesión. Esta propiedad puede ser la principal fuerza impulsora para la adhesión de la mayoría de los patógenos. Los microorganismos tienen muchas formas diferentes de usar el efecto hidrófobo con el fin de adherirse a sustratos (Hilbert *et al.* 2003).

Una característica importante de estudiar de los materiales es el patrón topográfico, ya que se pueden presentar fisuras, grietas y rajaduras que pueden

ser suficientemente grandes para contener las bacterias. La rugosidad de la superficie es generalmente considerada como una posible causa de las grandes discrepancias observadas entre las predicciones teóricas y las observaciones experimentales de las bacterias en las superficies. En la literatura, hay opiniones contradictorias sobre el efecto de las propiedades de superficie en el proceso de adhesión bacteriana. Varios estudios han demostrado que existe una correlación positiva entre la adhesión y la rugosidad de la superficie mayor, mientras que otros informan de que no correlación entre las irregularidades superficiales y la capacidad de las bacterias a adherirse. Este conflicto de opinión puede ser debido al grado de rugosidad de la superficie estudiada, las especies bacterianas ensayadas, los parámetros fisicoquímicos de la superficie, y la técnica de la utilizada para determinar la presencia de la célula en la superficie. Se ha planteado la hipótesis de que las bacterias preferentemente se adhieren a superficies más ásperas, por tres razones: una mayor superficie disponible para la fijación, la protección de las fuerzas de cizallamiento, y los cambios químicos que causan preferenciales interacciones fisicoquímicas (Hilbert *et al.* 2003, Rosmaninho *et al.* 2007).

## **2.8. Recubrimiento de superficies inertes**

Una de las estrategias más utilizadas para evitar la adhesión de microorganismos, agua u otros compuestos sobre superficies implica utilizar polímeros sintéticos para recubrir la superficie de los materiales. Con esto se reduce las posibles interacciones hidrofílicas entre las superficies y los posibles contaminantes.

Estos recubrimientos, al evitar la adherencia sobre las superficies, buscan reducir los problemas causados por los depósitos de sales, proteínas y grasas en los equipos, además de que se previene la formación de biopelículas de bacterias. Estos problemas como se ha mencionado son la reducción en la transferencia de calor, el aumento en la presión en tuberías, formación excesiva de hielo sobre las

superficies, la corrosión de las superficies, entre otros (Zhao *et al.* 2005a; Cao *et al.* 2009).

Los aspectos más importantes para la adherencia son la energía libre y el ángulo de aproximación de la partícula hacia la superficie. Es en la energía libre de la superficie donde interfieren los polímeros ya que las moléculas de estos son altamente hidrofóbicas y reducen la energía libre, y es la capa más exterior la encargada de dar la hidrofobicidad a la superficie, por esta característica se denominan superficies superhidrofóbicas. Entre más hidrofílica sea la superficie se favorece la adherencia, por lo que las superficies recubiertas muestran ciertas propiedades antimicrobianas (Zhao *et al.* 2005b).

Son muchos los materiales utilizados en el recubrimiento de las superficies, como el politetrafluoroetileno (PTFE) comúnmente llamado teflón, nanopartículas de Ni-P (Zhao *et al.* 2005a); resinas de un polímero de acrílico (estireno-butilmetacrilato-glicidilmetacrilato) (Cao *et al.* 2009); dímero de alquilcetona (AKD), polipropileno (PP), trimetilmetoxisilano (TMMOS), entre otros (Feng *et al.* 2002), siendo el aspecto más importante para estos recubrimientos es el tamaño de partícula del polímero utilizado.

## **2.9. Pulido de acero**

Los recubrimientos utilizados sobre las superficies de los equipos hechos de acero presentan un problema que limita su uso, principalmente en equipos que realicen trabajos que impliquen alguna presión. Este problema es que el recubrimiento puede desprenderse y contaminar con residuos el producto, además de que las zonas que quedan libres por el desprendimiento pueden ser atacadas por las sustancias corrosivas propias del alimento u ofrecer protección para los microorganismos y promover la formación de biopelículas (Zhao *et al.* 2005a).

Una alternativa para el recubrimiento es el pulido de la superficie, esto se hace con el objetivo de reducir las imperfecciones y los defectos visibles. Esta

técnica consiste en retirar una capa de metal de la superficie mediante una operación de abrasión, para lo cual se utilizan lijas de diferentes tamaños de grano. El tamaño del grano utilizado dependerá de que tan liso sea el acabado requerido. Debido al tratamiento se pueden generar polvos finos que pueden dañar al operador o dejar residuos.

Si es necesario un terminado mas liso se puede realizar un proceso de abrillantado, el cual consiste en frotar la superficie con líquidos, pastas o lijas de granos más finos. El resultado es una superficie finamente pulida y brillante. Debido al uso de pastas o líquidos este proceso puede dejar residuos tóxicos que pudieran ser transferidos a los productos elaborados, por lo que se han desarrollado técnicas alternativas de acabado que no dejen residuos peligrosos (Van Hecke 2006).

Dentro de este tipo de acero el más utilizado es el tipo 304, cuya composición es cromo 18-20%, níquel 8-11%, manganeso 2%, silicio 0.75%, carbono 0.08% y otros con menos de 0.08%. Las características más importantes es su alta resistencia a la corrosión y oxidación debida al contacto con los alimentos y por los detergentes utilizados en la limpieza y desinfección (Jullien *et al.* 2002, Van Hecke 2006). Específicamente el acabado 2B ofrece la mejor topografía de la superficie, ya que su bajo nivel de rugosidad en la superficie hace a este acero muy higiénico y fácil de limpiar, además de que se reduce la adhesión de los microorganismos (Jullien *et al.* 2002).

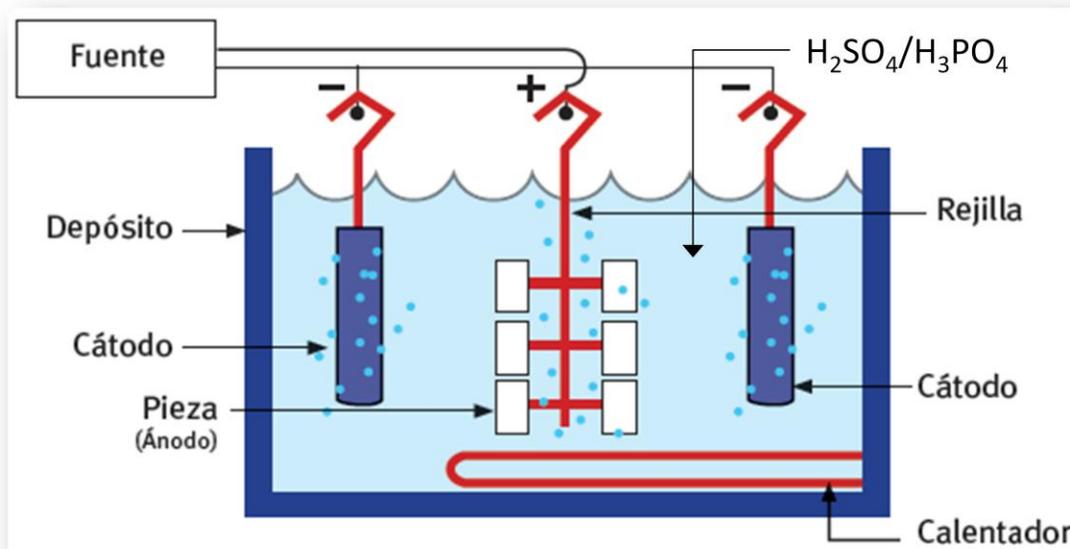
## **2.10. Electropulido**

Esta es una técnica de pulido que a diferencia de las mecánicas no utiliza lijas o arenas para obtener superficies lisas, el electropulido está basado en el proceso de electrólisis, dado por un flujo de corriente y una solución electrolítica, generalmente formada por una mezcla de ácido fosfórico y sulfúrico. El acabado va a depender de la intensidad de corriente y del tiempo de exposición. El brillo resultante depende de la eliminación de las crestas y valles microscópicas, es

decir, depende de la reducción de las microrugosidades (Chi-Cheng y Chi-Chang 2008).

A la mezcla de electrolisis se pueden adicionar otros elementos como agua, glicerol, entre otros, con el objetivo de reducir los costos y evitar que se formen depósitos de iones metálicos sobre la superficie y se ve afectado el resultado y se tengan zonas defectuosas (Jullien *et al.* 2002)

En la figura 6 se muestra el diagrama general de una celda electrolítica, los elementos a resaltar es la mezcla electrolítica, el ánodo es la pieza metálica a pulir, el cátodo puede ser otra pieza metálica, aunque es recomendable que sea del mismo material que el ánodo y la fuente de poder.

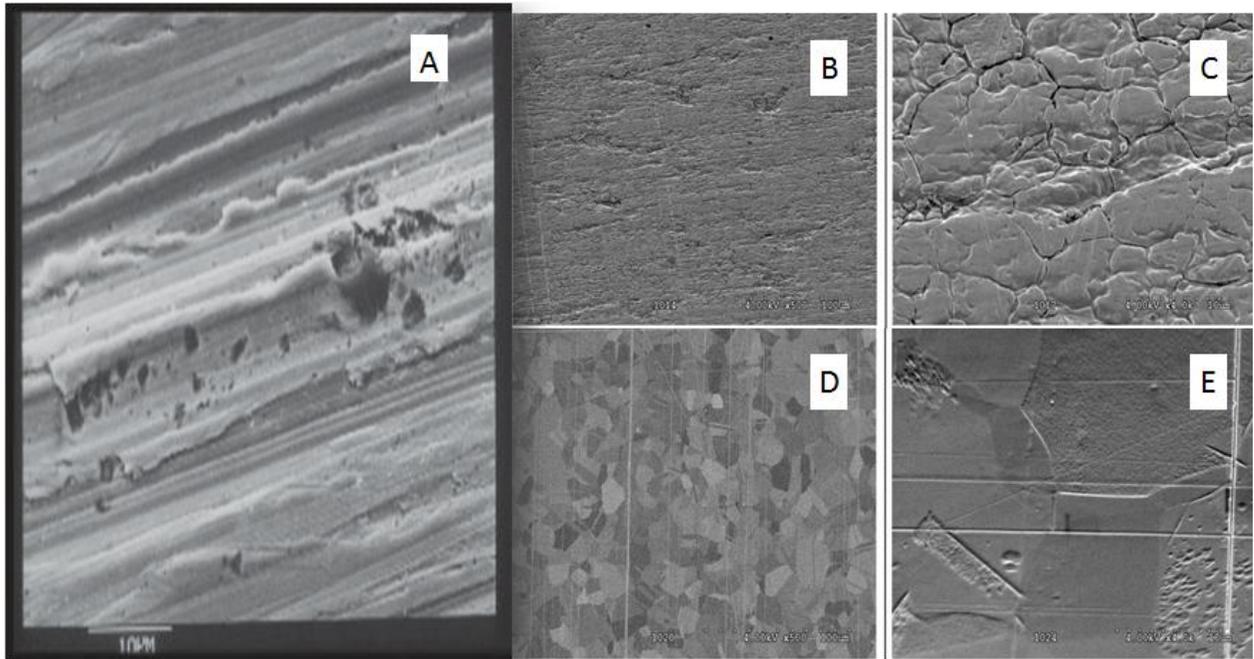


(Kosmoč 2010)

**Figura 6:** Diagrama general de una celda electrolítica

En la figura 7 se pueden observar micrografías que muestran la reducción de las crestas y valles de la superficie del acero inoxidable, en comparación con una placa pulida. Jullien y colaboradores en el 2002, demostraron que el terminado o grado de rugosidad de placas de diferentes tipos de acero es un factor significativo para darle el estatus de higiénico, es decir, que entre menor sea la rugosidad de la superficie será más higiénico el acero, es decir que las

superficies más lisas, además de aumentar la resistencia a la corrosión, son menos susceptibles a alojar contaminantes y su limpieza y mantenimiento es más fácil.



**Figura 7:** Micrografías de la superficie de placas de acero, A) placa de acero inoxidable sin pulir; B y C) placas de acero inoxidable pulido, 100 y 10  $\mu\text{m}$  respectivamente; D y E) placas de acero electropulido, 100 y 10  $\mu\text{m}$  respectivamente (Kosmač 2010 y Jullien *et al.* 2002).

### 2.11. Diseño de experimentos

La finalidad de realizar un experimento es obtener conclusiones generales a partir de las respuestas a determinadas condiciones experimentales. El diseñar adecuadamente los experimentos es el factor con mayor importancia para que la información sea confiable y las inferencias hechas a partir de esta información sean confiables. Por otro lado la cantidad de información dependerá del número de experimentos realizados, aunque este número dependerá de los factores económico, temporal, recursos materiales y técnicos, ente otros, por lo que el uso racional de estos recursos permitirá obtener la inferencia estadística más precisa posible con el mínimo coste.

Es por esto que el diseño estadístico de experimentos se debe usar como una metodología que permite plantear distintas estrategias para seleccionar, controlar, analizar e interpretar diferentes condiciones de estudio en un fenómeno de una manera objetiva y sistémica (Castaño y Domínguez 2010). Los mejores diseños serán aquellos que minimizan la varianza de los estimadores de los parámetros, lo cual es el objetivo final de un diseño de experimentos. Puesto que no se pueden minimizar todas las varianzas simultáneamente se intenta minimizarlas en algún sentido. En cada caso se tendrá que definir cuál es el criterio estadístico más apropiado, por lo que no se puede hablar de una fórmula universal, por lo que se han desarrollado una amplia gama de diseños de experimentos (Rodríguez Díaz 2001).

El proceso de planeación de un diseño de experimentos contempla los pasos de: 1) planteamiento del problema; 2) selección de los factores (variable de la cual interesa estudiar su efecto), y los niveles (puntos específicos o intervalos dentro de un factor); 3) selección de la variable respuesta; 4) plantear y efectuar el diseño experimental; 5) análisis de datos, y 6) plantear las conclusiones y recomendaciones que resulten del análisis de los resultados (Castaño y Domínguez 2010).

Se han desarrollado diferentes diseños de experimentos, que pueden ser utilizados según la información que se desee, los factores que se analizaran o la complejidad de las interacciones que haya entre los niveles, también es importante tomar en cuenta el tiempo y los recursos técnicos y económicos disponibles para la realización del experimento.

#### **2.11.1. Diseño óptimo de experimentos**

El primer reporte que se tiene de estos diseños de experimentos es del año de 1918 cuando Kristine Smith propuso un criterio para la regresión polinomial, a partir de este año se han realizado un sinnúmero de modificaciones y optimizaciones, debido a las ventajas que presenta. Este diseño de experimentos busca obtener a

mayor información con el menor número de experimentos, además de que esta información debe tener la menor varianza posible. Estos diseños permiten estimar parámetros sin sesgos y con mínima varianza, para lo cual requiere de un menor número de corridas experimentales, en comparación con los demás diseños de experimentos (Rodríguez Díaz 2001, López y Ramos 2007).

Para plantear un diseño óptimo se debe empezar por la elección del modelo de regresión, lo siguiente es determinar en qué condiciones experimentales, los factores y sus niveles, se debe medir la respuesta. Después se debe elegir el criterio de optimización, para obtener una mejoría en la calidad de la inferencia estadística con un bajo costo. Por último se debe utilizar un algoritmo para el cálculo del diseño, para lo cual se cuenta con un gran número de paquetes estadísticos.

Las ventajas de estos diseños son:

- La posibilidad de utilizar criterios estadísticos combinados o compuestos, lo que resulta en diseños razonablemente buenos desde varios puntos de vista;
- Estos diseños pueden reducirse a tamaños de muestra bajos, con una mayor utilidad y su cálculo es alcanzable;
- Existe la posibilidad de calcular diseños restringidos o definir los límites del dominio experimental, de modo que las condiciones de frontera no sean tan extremas y por tanto sea factible su medición en la práctica, estos límites pueden estar dados por condiciones de seguridad o limitaciones técnicas;
- Mediante la estandarización de los criterios se corrige el problema de invariancia con respecto a cambios de escala y proporciona diseños eficientes para todos los parámetros del modelo (Rodríguez Díaz 2001);
- Reducción en los costos de experimentación;
- Entre otras.

Las limitaciones son:

- Estos diseños son “modelo dependientes”, es decir, es necesario elegir previamente el modelo;
- El diseño es óptimo de acuerdo a un criterio, que depende de los objetivos del estudio estadístico y podría ser un “mal” diseño para los demás criterios;
- Se da el caso de que los diseños obtenidos exigen tomar observaciones extremas;
- Algunos criterios no son invariantes para cambios de escala, lo que significa darle una importancia desmedida a algunos parámetros con respecto a otros;
- Entre otros (Rodríguez Díaz 2001).

### 3. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

Evaluar un proceso de limpieza y desinfección utilizando agua electrolizada alcalina y neutra sobre acero inoxidable con y sin modificación superficial como modelos de las superficies utilizadas para el procesamiento de productos lácteos.

#### OBJETIVOS PARTICULARES

- ∞ Modificar, mediante un electropulido, y caracterizar la superficie del acero inoxidable del tipo 304 acabado 2B.
- ∞ Evaluar la actividad antimicrobiana del AE neutra sobre una mezcla de tres microorganismos en caldo.
- ∞ Evaluar la capacidad de adhesión de una mezcla de microorganismos sobre una superficie de acero con y sin modificación superficial.
- ∞ Evaluar un procedimiento alternativo de limpieza, usando un diseño experimental utilizando AE alcalina en tres concentraciones de cloro residual total, tres tiempos de contacto, tres temperaturas con y sin modificación superficial, seguido de un tratamiento de sanitización con AE neutra.
- ∞ Determinar las condiciones más eficientes para la remoción de los microorganismos adheridos sobre la superficie de acero inoxidable con y sin modificación superficial

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Electropulido de placas de acero inoxidable 304-2B

Para realizar el electropulido se siguió la metodología propuesta en la norma de la ATM B916 del 2002 con modificaciones personales hechas por el Ing. Monreal en 2011. El procedimiento comienza con un desengrasado por inmersión en una solución de sosa al 6%, durante 5 minutos a una temperatura de 70°C, la placa de acero se retira de la solución alcalina y se enjuaga con agua común. Después del desengrasado se realiza un activado de la superficie con ácido clorhídrico al 5% a temperatura ambiente durante 30 segundos, este activado se realiza para retirar la capa de óxido formada de forma natural en la superficie del acero que lo protege de la acción del oxígeno y ácidos que están en contacto con las superficies. El exceso de ácido se retira con agua común.

El electropulido se realiza en una cámara electroquímica, la placa a pulir se conecta al electrodo positivo (ánodo) y al electrodo negativo (cátodo) se conecta una pieza metálica cualquiera, generalmente se utiliza una pieza del mismo material. La densidad de corriente debe estar entre 20 y 37 Amp/dm<sup>2</sup> y se debe estimar toda el área de la pieza para que la corriente sea homogénea. Para las piezas con las que se trabajaron el proceso se realizó a una intensidad de corriente de 2.5 Amp, durante 6 minutos y a una temperatura de 80°C.

Después del electropulido es necesario realizar un pasivado de la superficie, para favorecer la formación de una capa de óxido sobre la superficie, esto se realiza sumergiendo la placa en una solución de ácido nítrico al 30% a una temperatura de 71°C durante 20 minutos. El exceso de ácido se retira con agua común y se seca la placa.

### 4.2. Conservación de microorganismos

En este trabajo se utilizaron las siguientes bacterias: *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, estos microorganismos se

cultivaron bajo las condiciones optimas para cada uno (Tabla 3) y en un medio de cultivo nutritivo (caldo soya tripticaseína), para favorecer su crecimiento y asegurar cuentas altas.

**Tabla 3:** Condiciones de cultivo de los microorganismos utilizados

<b>Microorganismo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (horas)</b>	<b>Medio de cultivo</b>
<i>E. faecalis</i>	30	24	Caldo agar soya tripticaseína
<i>M. luteus</i>	30	48	
<i>P. aeruginosa</i>	37	24	

Para la conservación de los microorganismos se utilizan chaquiras de vidrio, y se lavan con una solución de ácido clorhídrico, para neutralizar la alcalinidad propia del vidrio. Se enjuagan las chaquiras con agua destilada hasta pH neutro. Se esterilizan en seco.

Por otro lado se prepara un cultivo, bajo condiciones óptimas, de cada microorganismo, para posteriormente inocular en un tubo inclinado con agar soya-tripticaseína (AST), después del tiempo de incubación respectivo se realiza una suspensión del microorganismos con una mezcla 1:1 de leche descremada 20% p/v y glicerol al 20%v/v.

Se colocan aproximadamente 30 chaquiras estériles en un vial estéril y se vierte la suspensión microbiana, se agita para que todas las chaquiras se cubran con esta y se colocan chaquiras en cada microtubo estéril. Los microtubos se almacenan en ultracongelación a -70°C (Gherna 1994).

#### **4.3. Mezcla de microorganismos**

Para realizar la mezcla de los microorganismos se toma un microtubo de las conservas de cada cultivo y se activa por separado en 10 ml caldo soya-tripticaseína (CST) a las condiciones óptimas para cada uno. La mezcla de microorganismos se prepara con 1ml del CST de cada cultivo, el cual se centrifuga

a 4000 rpm por 4 min, el precipitado se lava con solución salina (SS) al 0.85% y se centrifuga bajo las mismas condiciones. El precipitado se resuspende en el mismo volumen de SS y se mezclaron en el mismo tubo, este tubo se agita para homogeneizar la mezcla.

#### **4.4. Capacidad antimicrobiana del AE neutra**

Para determinar la capacidad antimicrobiana del AE neutra (Desy®) se pone en contacto la mezcla de microorganismos (alrededor de  $10^6$  UFC/mL) a diferentes tiempos (30, 90 y 180 s) con una solución a diferentes concentraciones de cloro residual (5,10, 20, 30 y 40 ppm). En un tubo con 9 ml de la solución de AE neutra se coloca un mililitro de la mezcla de microorganismos, de acuerdo a los tiempos de contacto correspondiente. Se toma un mililitro y se traspasa a un tubo con 9 ml de buffer de neutralización (Difco, fosfato monobásico de potasio, tiosulfato de sodio y arilsulfonato), se deja actuar por 30 segundos para después realizar diluciones decimales seriadas en SS. Las células supervivientes al tratamiento con AE neutra (Desy®) se pueden determinar por la técnica de Miles-Misra en AST o extensión en superficie, las cajas se incuban a 30°C por 24 horas independientemente de la técnica de conteo.

#### **4.5. Capacidad de adhesión de la mezcla de microorganismos sobre la superficie de acero**

Las placas de acero estériles (180°C por 2 h) se pre-acondicionan con 400 µL leche cruda, este volumen se extiende con un hisopo estéril para cubrir toda la superficie, se deja secar por 10 min en la campana de flujo laminar. Después de este tiempo se colocan dos inóculos 400 µL de la mezcla de microorganismos (alrededor de  $10^6$  UFC/mL), después de cada uno se deja secar 15 y 30 min respectivamente (Walker *et al.* 2005b, Jullien *et al.* 2002). La recuperación de células se realiza con dos hisopos estériles húmedos con SS, uno por cada mitad de la placa, la placa se frota en cuatro direcciones (vertical, horizontal y dos diagonales) para recuperar la mayor cantidad de células. Los hisopos se colocan en un tubo con 10 mL de SS, el cual se agita en el vortex por 1 min, posteriormente se realizan las diluciones decimales seriadas necesarias. El

recuento de células recuperadas se lleva a cabo en AST después de 24 horas de incubación.

#### 4.6. Proceso de lavado y desinfección con AE alcalina y AE neutra

Placas de acero inoxidable se inoculan de acuerdo con metodología descrita en (4.4). Después del segundo secado del inóculo se realiza un enjuague con agua destilada estéril, posteriormente se lleva a cabo el proceso de lavado, para el cual se sumerge la placa de acero en 400 mL de AE alcalina, a la concentración correspondiente, y se deja el tiempo indicado para cada tratamiento en el diseño experimental. Posteriormente, se coloca la placa en otro recipiente para la etapa de desinfección usando 400 mL de AE neutra (Desy®) diluida a una concentración de 40 ppm de cloro residual total, esta etapa de desinfección se efectúa por 3 min. Para neutralizar la acción del cloro se enjuaga la placa con 15 mL de amortiguador neutralizante. La recuperación de células y recuento se realiza como en el apartado anterior.

#### 4.7. Diseño Óptimo de Experimentos

**Tabla 4.** Diseño del experimento

Factores	Niveles		
	1	0	1
Tiempo de exposición (min)	10	20	30
Concentración de AE alcalina (ppm)	100	200	300
Temperatura (°C)	30	40	50
Modificación superficie	Sin		Con

**Tabla 5:** Tratamientos del diseño óptimo (16 tratamientos y 2 réplicas)

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Modificación</b>
1	10	100	40	Sin
2	20	100	50	Sin
3	30	300	30	Con
4	10	100	30	Con
5	30	100	50	Con
6	10	300	30	Con
7	30	300	50	Con
8	30	100	30	Sin
9	10	100	30	Con
10	10	300	30	Con
11	20	200	40	Con
12	30	300	30	Con
13	10	100	40	Sin
14	30	300	50	Con
15	10	200	30	Sin
16	30	100	50	Con
17	10	100	30	Con
18	30	200	50	Sin
19	20	300	30	Sin
20	20	300	30	Sin
21	20	100	50	Sin
22	10	300	50	Sin
23	30	300	40	Sin
24	10	200	30	Sin
25	20	100	50	Sin
26	10	100	50	Con
27	30	300	50	Con

**Tabla 5:** Continuación

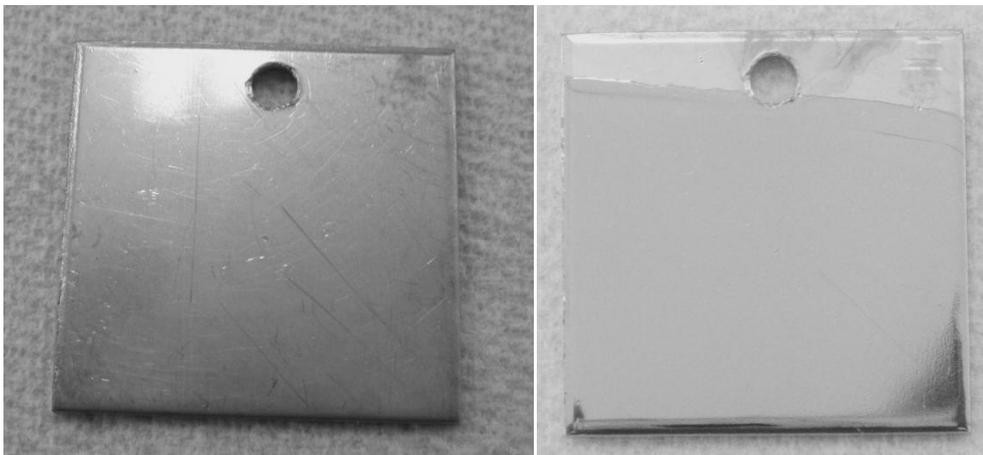
<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Modificación</b>
<b>28</b>	10	300	50	Sin
<b>29</b>	30	100	30	Sin
<b>30</b>	10	300	30	Con
<b>31</b>	10	300	50	Con
<b>32</b>	30	200	50	Sin
<b>33</b>	30	300	30	Con
<b>34</b>	20	300	30	Sin
<b>35</b>	10	200	30	Sin
<b>36</b>	30	100	50	Con
<b>37</b>	10	300	50	Con
<b>38</b>	10	100	50	Con
<b>39</b>	30	300	40	Sin
<b>40</b>	20	200	40	Con
<b>41</b>	30	200	50	Sin
<b>42</b>	10	100	50	Con
<b>43</b>	20	200	40	Con
<b>44</b>	30	100	30	Sin
<b>45</b>	10	300	50	Sin
<b>46</b>	30	300	40	Sin
<b>47</b>	10	100	40	Sin
<b>48</b>	10	300	50	Con

Se considera como unidad experimental a las placas de acero pre-acondicionadas con leche cruda de vaca, inoculada con una mezcla de bacterias. La variable respuesta es la población microbiana remanente por centímetro cuadrado, y las unidades serán UFC/cm<sup>2</sup>.

## 5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 5.1. Electropulido de placas de acero inoxidable 304-2B

Las placas electropulidas (Figura 8), no presentan defectos notables a simple vista, además de que la superficie se ve más brillante en comparación con las placas que no fueron sometidas a este procedimiento. La superficie electropulida además se ve más brillante, lo cual es un indicativo de que la rugosidad es menor.

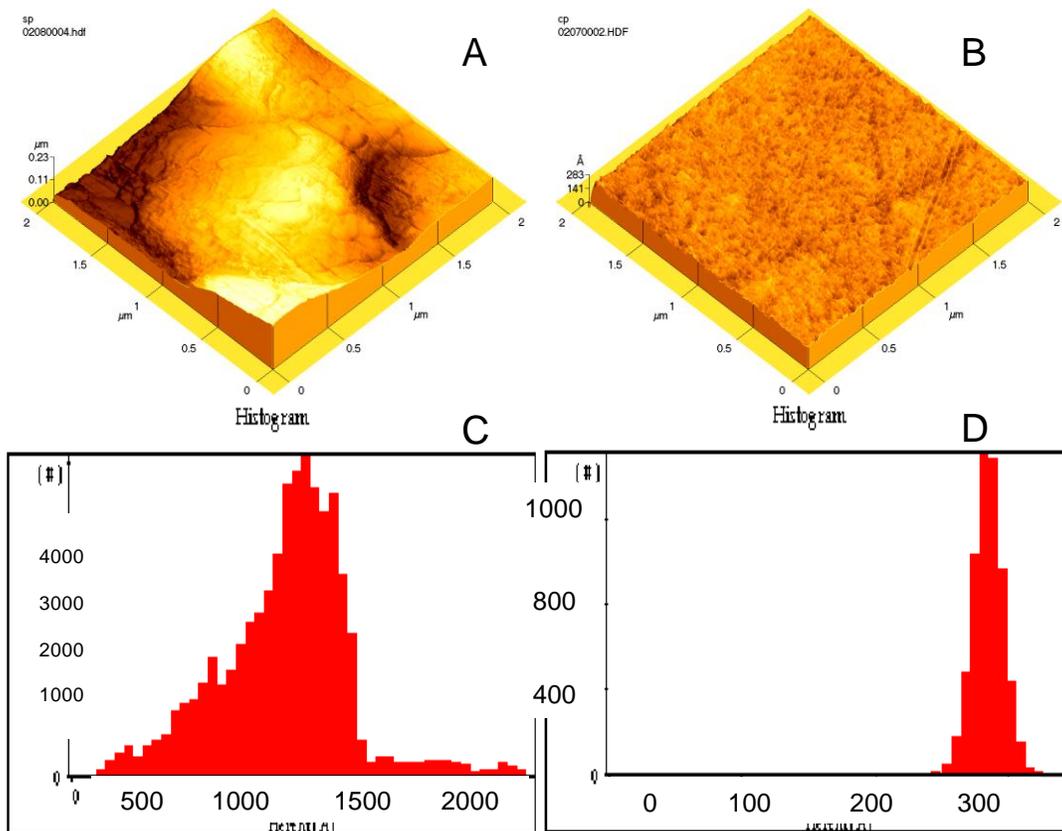


**Figura 8:** Placas electropulidas, A) antes del procedimiento de electropulido, B) Después del proceso de electropulido

Para comprobar lo observado se analizó la superficie de las placas mediante una microscopía de fuerza atómica (Figura 7 A y B). Esta técnica de microscopia proporciona imágenes tridimensionales en una escala nanométrica, mediante la medición de fuerzas atómicas entre la superficie y una sonda a una distancia muy corta (0.2-10 nm). En las micrografías se pueden observar las imágenes tridimensionales, en donde las zonas que se observan de un color blanco o amarillo claro están más altas en comparación con las zonas más oscuras. Para las placas pulidas se observa una alta heterogeneidad en la superficie, ya que se observa una gran diferencia de alturas entre las crestas y valles, en contraste las placas electropulidas presentan una alta uniformidad en lo

que respecta a la superficie, es decir que no presenta diferencias importantes entre las crestas y valles.

Por otro lado, el equipo utilizado grafica un histograma (Figura 7 C y D) para visualizar de una forma más sencilla la rugosidad promedio de la superficie. En estos histogramas se puede observar que las placas que solo tienen el acabado de pulido normal para este tipo de acero inoxidable tienen una amplia distribución en cuanto a la rugosidad de la superficie, mientras que para las placas electropulidas se observa que esta rugosidad tiene una menor distribución, es decir que es más homogénea y no presenta irregularidades importantes en la superficie.



**Figura 9:** Micrografía de Fuerza atómica de placas de acero inoxidable, A) placa pulida; B) placa electropulida; C) histograma de rugosidad promedio de placas pulidas; D) histograma de rugosidad promedio de placas electropulidas

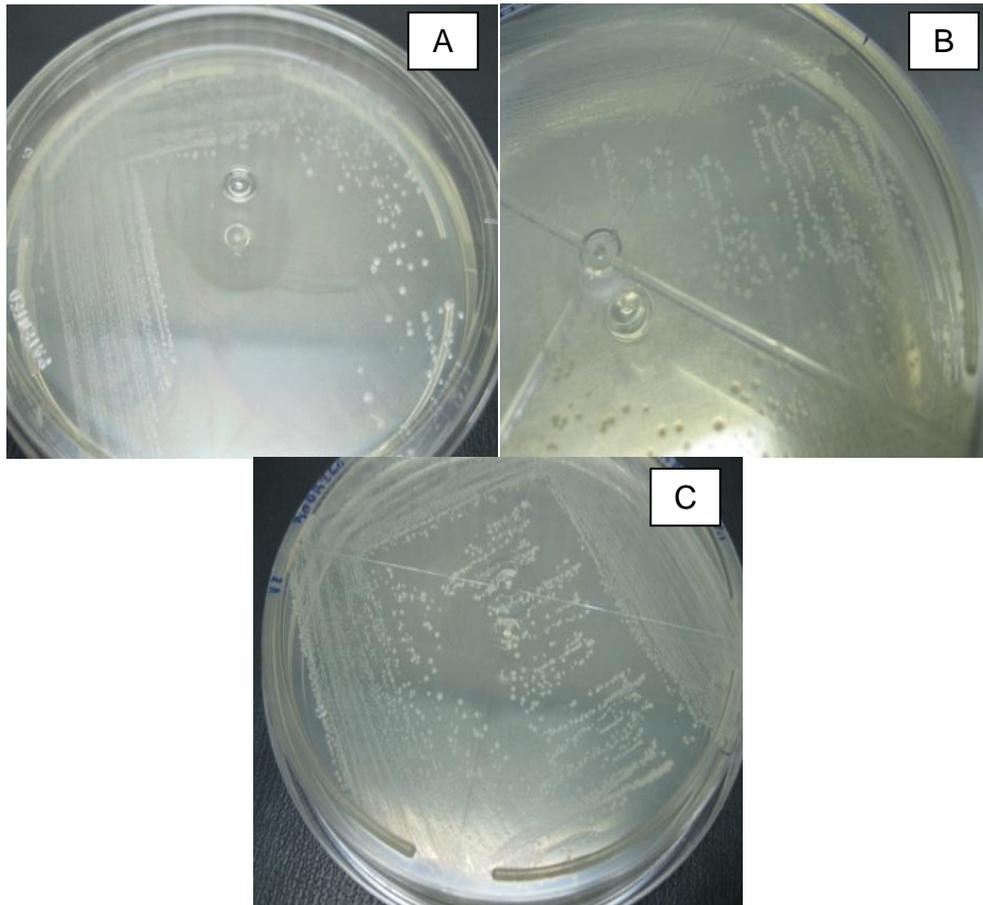
En las microscopias de fuerza atómica además de las claras diferencias que se observan en cuanto a la homogeneidad de la superficie, es importante resaltar la diferencia en las escalas, ya que en la imagen no es apreciable. La micrografía de la placa pulida (figura 9 A) está en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) y va desde 0.0 a 0.9 y para las placas electropulidas (figura 9 B) está en Angstrom ( $\text{\AA}$ ) y va desde 0 a 300. Esta diferencia nos da otra idea de las diferencias en la superficie después del procedimiento de electropulido.

La rugosidad promedio para las placas de acero inoxidable bajo de 32.7 nm a 2.16 nm, lo que representa una disminución de más del 90% de la rugosidad superficial. Jullien y colaboradores en 2002, mencionan que una superficie más lisa es más fácil de limpiar ya que no ofrece una protección física a las esporas de *B. cereus*, por tanto podría decirse que es más higiénica ya que es más fácil de limpiar, además mencionan que del acero inoxidable 304 con acabado 2B hay una adhesión ligeramente mayor en comparación con la superficie electropulida, esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Chi Cheng y Chi Chang en el 2008 utilizando una mezcla de ácidos fosfórico y sulfúrico, y glicerol redujeron la rugosidad promedio de 44.7 nm a 7.3 nm, lo que representa una reducción de alrededor del 85%. Estos autores mencionan que el factor con más relevancia durante el electropulido es el tiempo durante el cual se realiza el electropulido, con menor significancia se encuentran la densidad de corriente por área y la temperatura a la cual se realiza el proceso. Si se deja por mucho tiempo el metal a pulir dentro de la mezcla electrolítica el metal se desgasta y comienzan a aparecer imperfecciones en la superficie por el desgaste excesivo. Estas imperfecciones son notorias a simple vista y se ven como picaduras sobre la superficie, que además de disminuir el brillo de la superficie podrían ofrecer nichos protegidos y la posterior formación de depósitos de minerales, proteínas o biopelículas bacterianas.

## 5.2. Mezcla de microorganismos

Después de realizar las conservar en chaquiras de vidrio se realizó una activación de una conserva para comprobar la pureza. Pasado el tiempo de incubación se pudo observar una sola morfología colonial en las cajas. Estas observaciones se verificaron con una tinción de Gram para cada microorganismo, observándose una sola morfología celular, así como el Gram específico para cada microorganismo. En la figura 10 se observan los cultivos puros para cada microorganismo.



**Figura 10:** Cajas con cultivo puro de A) *E. faecalis*; B) *M. luteus*; C) *P. aeruginosa*

Para determinar la población microbiana de la mezcla se activó otra conserva, a las condiciones óptimas para cada bacteria, después de la activación de los cultivos se realizó un recuento por separado para cada cultivo, por la técnica de Miles-Misra, los conteos fueron:

$$E. faecalis: \frac{34 \text{ UFC}}{20 \mu\text{L}} \left( \frac{10^3}{1\text{mL}} \right) = 1.7 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$$

$$P. aeruginosa: \frac{30 \text{ UFC}}{20 \mu\text{L}} \left( \frac{10^3}{1\text{mL}} \right) = 1.5 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$$

$$M. luteus: \frac{7 \text{ UFC}}{20 \mu\text{L}} \left( \frac{10^3}{1\text{mL}} \right) = 3.5 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$$

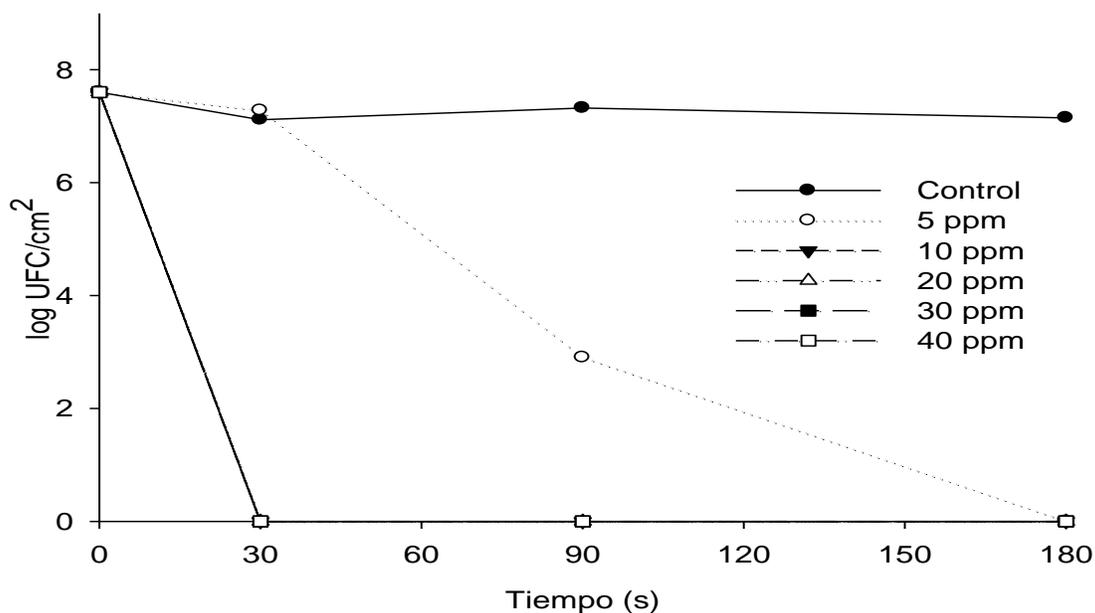
Después de realizar la mezcla, el conteo de microorganismos fue de  $\frac{18 \times 10^7 \text{ UFC}}{0.02 \text{ mL}} = 9 \times 10^9 \text{ UFC/cm}^2$ . El nivel de inóculo en la mezcla es alto, debido al tiempo de incubación de los cultivos y a que los microorganismos aun se encuentran en la fase logarítmica de la curva de crecimiento, esto de acuerdo con observaciones anteriores. A pesar de que el *M. luteus* no tenía un crecimiento al nivel de los otros dos microorganismos no se dio una dilución en la mezcla.

### 5.3. Capacidad antimicrobiana del AE neutra

Los resultados para la capacidad bactericida se muestran en la tabla 6, para su mejor visualización se muestra también esta información en la figura 11.

**Tabla 6:** Actividad antimicrobiana del AE neutra (Desy®) sobre la mezcla de microorganismos a diferentes tiempos de exposición

Concentración (ppm)	Tiempo de contacto (s)	Log UFC/mL	Concentración (ppm)	Tiempo de contacto (s)	Log UFC/mL
Control	0	7.6	20	0	7.6
	30	7.1		30	0.0
	90	7.3		90	0.0
	180	7.1		180	0.0
5	0	7.6	30	0	7.6
	30	7.3		30	0.0
	90	2.9		90	0.0
	180	0.0		180	0.0
10	0	7.6	40	0	7.6
	30	0.0		30	0.0
	90	0.0		90	0.0
	180	0.0		180	0.0



**Figura 11:** Capacidad antimicrobiana del AE neutra (Desy®) sobre la mezcla de microorganismos a diferentes tiempos.

Se observa que el control mantiene un nivel casi constante a lo largo del experimento. El tratamiento con 5 ppm de cloro residual total muestra una disminución lenta, en comparación con las otras concentraciones, a los 30 segundos no tuvo una reducción significativa ( $p > 0.05$ ) en comparación con el control, a los 90 segundos se presentó una reducción de alrededor de 4 logaritmos y a los 180 segundos la población estaba por debajo del límite de detección del método empleado. A partir de la concentración de 10 ppm de cloro residual total se observa que una reducción significativa ( $p > 0.05$ ), es decir que la reducción fue mayor los 7 logaritmos desde los 30 segundos.

El proceso de desinfección con AE neutra, ya se ha estandarizado en trabajos anteriores, y se utilizan 40 ppm de cloro residual total; con estos resultados queda demostrado que esta concentración está por encima de la concentración necesaria para tener una reducción significativa en la población de la mezcla utilizada en el trabajo. La razón por la cual no se utiliza una concentración más baja (10, 20 o 30 ppm de cloro residual total), durante la

desinfección es porque la materia orgánica de la leche puede interferir en la efectividad del AE neutra. Estos resultados concuerdan con lo mostrado por Ayebah y colaboradores en el 2005 y 2006, estos autores sostienen que ante la presencia de materia orgánica disminuye el potencial Redox y la concentración de cloro residual, con lo que la actividad bactericida disminuye conforme aumenta la concentración de materia orgánica en el medio. También demuestran que la actividad aumenta directamente al aumentar el tiempo de exposición.

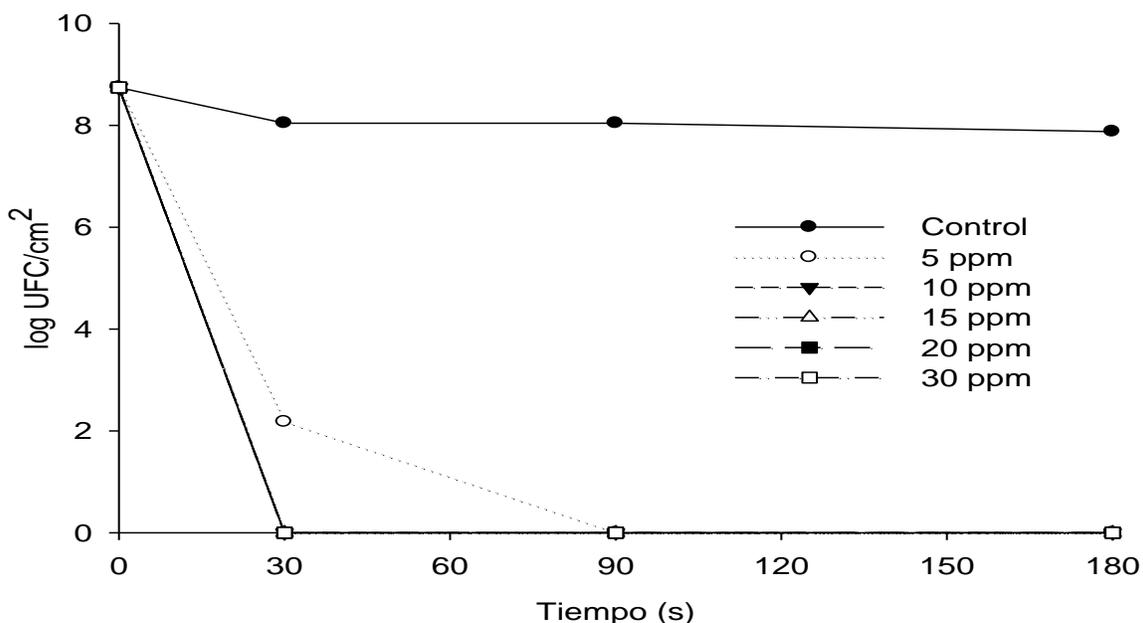
Se realizó una comparación del AE neutra de Desy® con una muestra de AE neutra del departamento de electroquímica de la unidad de CIDETEQ del estado de Querétaro, se trabajo bajo las mismas condiciones y los resultados se muestran en la tabla 7 y en la figura 12. Se puede observar que a los 30 segundos de contacto con el AE neutra del CIDETEQ sobre la mezcla de microorganismos hay una disminución significativa ( $p > 0.05$ ) de alrededor de 6 ciclos logarítmicos, para los tiempos de contacto restantes la reducción fue hasta por debajo del límite de detección del método. En base a estos resultados se puede decir que el AE neutra del CIDETEQ tiene una mayor actividad contra la mezcla de microorganismos, esta diferencia se puede atribuir al potencial Redox o a la concentración de otros agentes oxidantes además del cloro residual.

**Tabla 7:** Actividad antimicrobiana AE neutra (CIDETEQ) sobre la mezcla de microorganismos a diferentes tiempos de exposición

Concentración (ppm)	Tiempo de contacto (s)	Log UFC/mL	Concentración (ppm)	Tiempo de contacto (s)	Log UFC/mL
<b>Control</b>	0	8.7	20	0	8.7
	30	8.0		30	0.0
	90	8.0		90	0.0
	180	7.9		180	0.0
<b>5</b>	0	8.7	30	0	8.7
	30	2.2		30	0.0
	90	0.0		90	0.0
	180	0.0		180	0.0

**Tabla 7:** Continuación

Concentración (ppm)	Tiempo de contacto (s)	Log UFC/mL	Concentración (ppm)	Tiempo	
				de contacto (s)	Log UFC/mL
10	0	8.7	40	0	7.6
	30	0.0		30	0.0
	90	0.0		90	0.0
	180	0.0		180	0.0



**Figura 12:** Capacidad bactericida del AE neutra (CIDETEQ) sobre la mezcla de microorganismos a diferentes tiempos.

Los resultados mostrados por el AE neutra de ambas fuentes concuerdan con lo observado por Arevalos-Sánchez y colaboradores en el 2012, estos investigadores prueban este nuevo agente antimicrobiano contra *L. monocytogenes* Scott A, a los 30 segundos de contacto con el microorganismo el AE neutra Desy® y a una concentración de 20 ppm de cloro residual, logro una

reducción en la población de *L. monocytogenes* mayor a los 6 logaritmos, a una temperatura de 30°C. Si esta temperatura disminuye (4°C) el tiempo de contacto necesario. A una concentración de 15 ppm de cloro residual la reducción fue menor para el mismo tiempo.

Para el presente estudio la concentración de cloro residual necesario para una reducción fue menor, 10 ppm para ambas AE neutras, esto podría ser por la sensibilidad de los microorganismos a las especies reactivas. Otra razón para esta diferencia sería la presencia de las sustancias poliméricas extracelulares que dan una protección extra a la célula.

#### **5.4. Capacidad de adhesión de la mezcla de microorganismos sobre la superficie de acero**

Fue necesario estandarizar este procedimiento, de acuerdo a lo reportado por Walker y colaboradores en el 2005. Los cambios realizados fueron debido a inicialmente no se logró recuperar a los microorganismos adheridos a la superficie, las modificaciones realizadas fueron un preacondicionamiento con leche cruda y se utilizar dos hisopos en lugar de uno para la recuperación de células de la superficie.

Se realizaron dos experimentos independientes para determinar la capacidad de adhesión sobre la superficie de acero, los resultados se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8:** Población microbiana recuperada de la superficie de acero preacondicionado (pruebas preliminares)

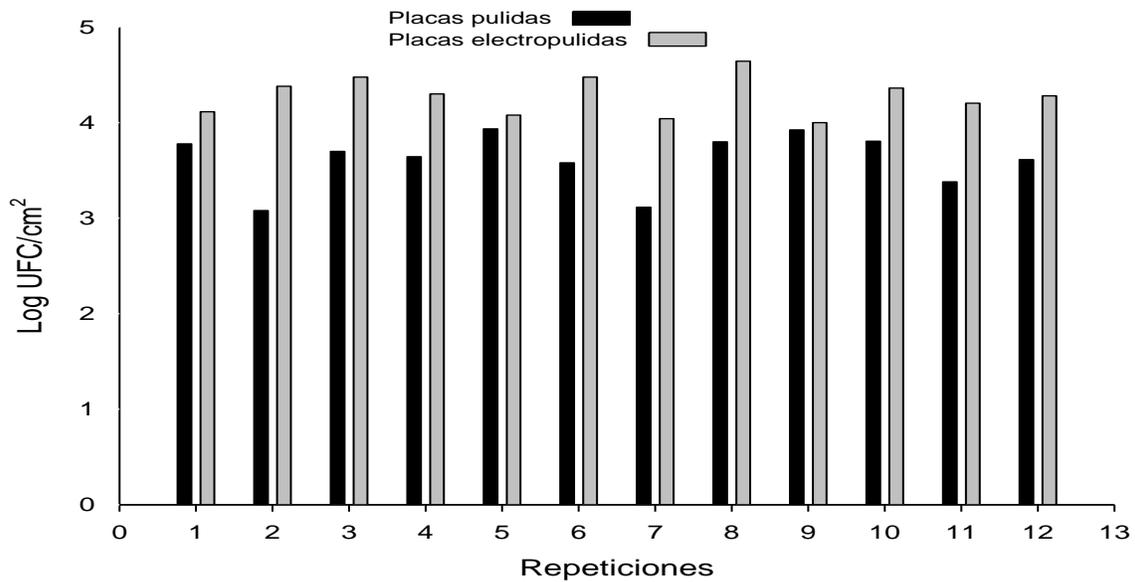
<b>Experimento</b>	<b>Placa 1 (UFC/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Placa 2 (UFC/cm<sup>2</sup>)</b>
<b>Primero</b>	1.5x10 <sup>4</sup>	2.2x10 <sup>4</sup>
<b>Segundo</b>	7.3x10 <sup>4</sup>	1.2x10 <sup>4</sup>

Los tratamientos del diseño experimental se realizaron en lotes de cuatro a la vez por lo que se necesitó incluir controles sin tratamiento para cada grupo. Los controles también nos ayudan a verificar la adhesión de los microorganismos sobre la superficie, estos resultados se muestran en la tabla 9 y gráficamente en la figura 13.

**Tabla 9:** Población microbiana recuperada de la superficie de las placas de acero inoxidable

<b>Controles sin tratamiento</b>	<b>Placas pulidas</b>	<b>Placas electropulidas</b>
<b>1</b>	3.8	4.1
<b>2</b>	3.1	4.4
<b>3</b>	3.7	4.5
<b>4</b>	3.6	4.3
<b>5</b>	3.9	4.1
<b>6</b>	3.6	4.5
<b>7</b>	3.1	4.0
<b>8</b>	3.8	4.6
<b>9</b>	3.9	4.0
<b>10</b>	3.8	4.4
<b>11</b>	3.4	4.2
<b>12</b>	3.6	4.3

La concentración de células de la mezcla es de alrededor de  $10^9$  UFC/mL, si se toma en cuenta el inóculo y el área en la cual es extendido esta concentración es de alrededor de  $10^6$  UFC/mL. Las células recuperadas de las placas están alrededor de  $10^4$  UFC/mL, esta diferencia se puede deber a que la topografía de la superficie dificulta la recuperación de las mismas, otra causa puede ser la técnica de recuperación. Esta técnica de recuperación por frotación con hisopo fue estandarizada en el laboratorio, además para el experimento es la técnica adecuada.



**Figura 13:** Población microbiana recuperada de las superficies pulida y sin pulir de acero inoxidable preacondicionada con leche cruda

Hilbert y colaboradores en el 2003 concluyen que la rugosidad de la superficie no afecta a la remoción de las células adheridas ni a la resistencia del material a la corrosión de la misma.

Estos resultados concuerdan con lo observado en este trabajo, ya que hay una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre las poblaciones para las placas pulidas en comparación con las electropulidas. Se observa que para las placas de acero electropulidas se tiene una recuperación mayor en comparación con las placas pulidas, lo cual se puede atribuir a la rugosidad de la superficie y debido a la presencia de microirregularidades en la topografía se pueden crear nichos protegidos para las células, con lo que se dificulta la recuperación.

### 5.5. Diseño experimental óptimo

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos para los tratamientos del diseño experimental óptimo y sus réplicas. Estos resultados se analizaron con el programa estadístico JMP 5.0.1.

Debido a las limitaciones de control de temperatura en incubadoras diferentes, se realizaron 4 tratamientos al día, además de los controles para cada tipo de superficie (placas pulidas y electropulidas).

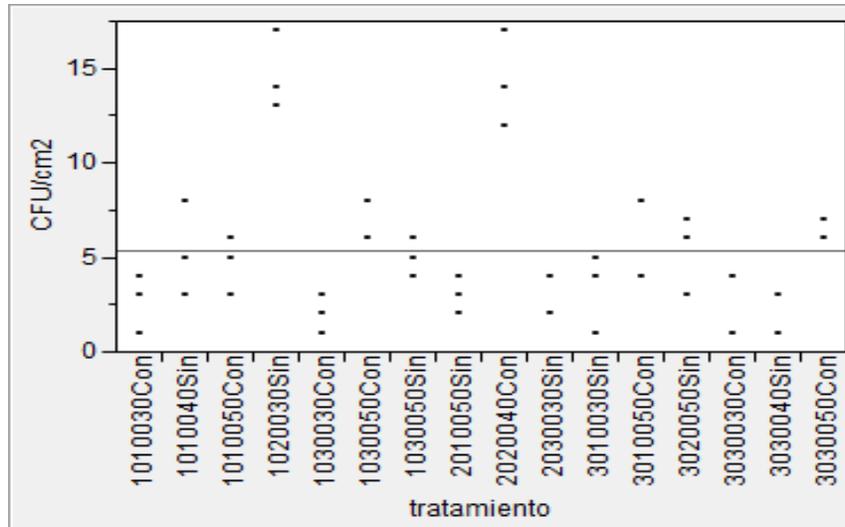
**Tabla 10:** Tratamientos del diseño óptimo y variable respuesta

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Modificación</b>	<b>UFC/cm<sup>2</sup></b>
1	10	100	40	Sin	5
2	20	100	50	Sin	3
3	30	300	30	Con	1
4	10	100	30	Con	1
5	30	100	50	Con	4
6	10	300	30	Con	1
7	30	300	50	Con	6
8	30	100	30	Sin	5
9	10	100	30	Con	3
10	10	300	30	Con	2
11	20	200	40	Con	12
12	30	300	30	Con	4
13	10	100	40	Sin	8
14	30	300	50	Con	6
15	10	200	30	Sin	17
16	30	100	50	Con	8
17	10	100	30	Con	4
18	30	200	50	Sin	7
19	20	300	30	Sin	2
20	20	300	30	Sin	2
21	20	100	50	Sin	4
22	10	300	50	Sin	5
23	30	300	40	Sin	1
24	10	200	30	Sin	14

**Tabla 10:** Continuación

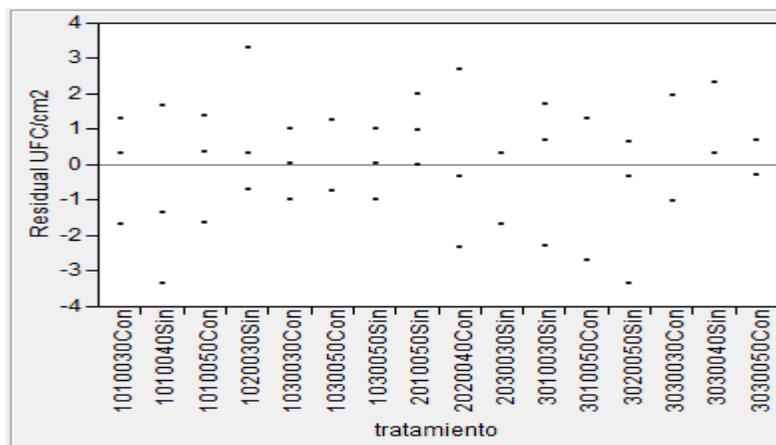
<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Modificación</b>	<b>UFC/cm<sup>2</sup></b>
<b>25</b>	20	100	50	Sin	2
<b>26</b>	10	100	50	Con	6
<b>27</b>	30	300	50	Con	7
<b>28</b>	10	300	50	Sin	6
<b>29</b>	30	100	30	Sin	1
<b>34</b>	20	300	30	Sin	4
<b>35</b>	10	200	30	Sin	13
<b>36</b>	30	100	50	Con	8
<b>37</b>	10	300	50	Con	8
<b>38</b>	10	100	50	Con	3
<b>39</b>	30	300	40	Sin	3
<b>40</b>	20	200	40	Con	17
<b>41</b>	30	200	50	Sin	3
<b>42</b>	10	100	50	Con	5
<b>43</b>	20	200	40	Con	14
<b>44</b>	30	100	30	Sin	4
<b>45</b>	10	300	50	Sin	4
<b>46</b>	30	300	40	Sin	1
<b>47</b>	10	100	40	Sin	3
<b>48</b>	10	300	50	Con	6

Es necesario verificar que los resultados para los tratamientos y sus replicas no están muy dispersos y que la variación entre ellos sea pequeña. Para esto se realizó una grafica (Figura 14), donde se agruparon los tratamientos y sus replicas, de la cual se puede concluir que entre los datos obtenidos, para cada tratamiento y sus replicas no hay una variabilidad importante, por lo que se procedió a analizar los datos con el programa estadístico.



**Figura 14:** Resultado de los tratamiento y sus replicas

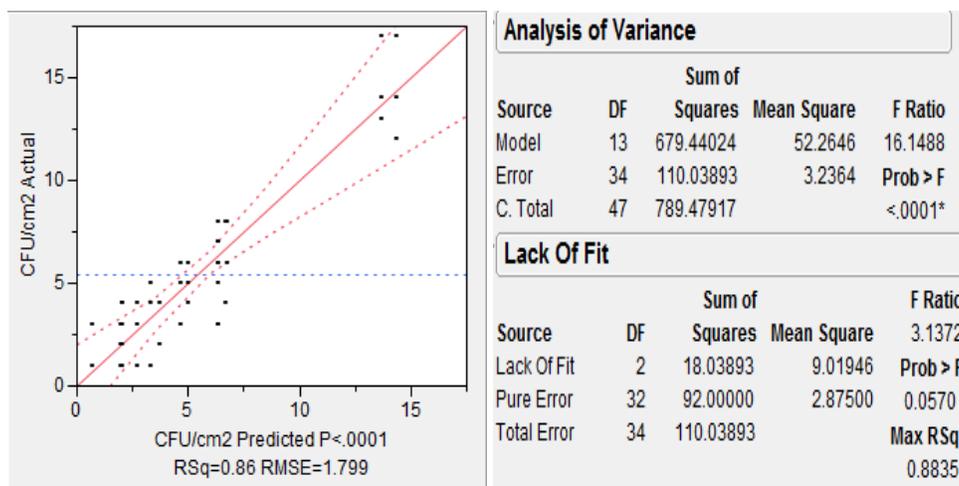
El análisis de residuales (Figura 15), es otra herramienta que ayuda a verificar si los datos presentan tendencias o sesgos que pudieran interferir en el análisis estadístico, haciendo poco confiable las inferencias resultantes. Para este caso esta grafica de residuales muestra que no hay una tendencia en los datos anormal, es decir que todos se encuentran dentro de un área no muy alejada de la media, por lo tanto los datos son confiables desde este punto de vista.



**Figura 15:** Residuales para cada tratamiento y su replica

Al realizar el análisis estadístico se observa que el modelo es significativo con un valor de significancia de  $p < 0.05$  y con una  $R^2$  de 0.8606. El modelo

tampoco muestra carencia de ajuste, como se observa en la figura 16. Estos resultados ofrecen la certeza necesaria como para que las inferencias estadísticas realizadas a partir del modelo van a ser confiables.



**Figura 16:** Análisis de varianza del diseño óptimo

Los factores principales que tienen significancia estadística (Figura 17), son el tiempo, la concentración de AE alcalina y la modificación superficial, además de las interacciones dobles tiempo-modificación y temperatura-modificación. El término cuadrático de la concentración también tiene significancia estadística.

Source	Nparm	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
Time	1	1	26.05731	8.0512	0.0076*
Concentration	1	1	45.64889	14.1047	0.0006*
Temperature	1	1	0.03988	0.0123	0.9123
Modification	1	1	36.07655	11.1470	0.0021*
Time*Concentration	1	1	9.90830	3.0615	0.0892
Time*Temperature	1	1	0.39479	0.1220	0.7290
Time*Modification	1	1	78.24957	24.1777	<.0001*
Concentration*Temperature	1	1	12.72812	3.9328	0.0555
Concentration*Modification	1	1	0.10164	0.0314	0.8604
Temperature*Modification	1	1	67.98043	21.0047	<.0001*
Time*Time	1	1	4.28639	1.3244	0.2578
Concentration*Concentration	1	1	313.92928	96.9984	<.0001*
Temperature*Temperature	1	1	11.94990	3.6923	0.0631

**Figura 17:** Efectos significativos del diseño óptimo

Tomando los factores significativos se puede armar el modelo para este diseño óptimo, el cual es:

$$y = -0.0007X_2^2 + 0.137X_3X_4 + 0.149X_1X_4 + 0.924X_4 - 0.012X_2 - 0.089X_1 + 17.436$$

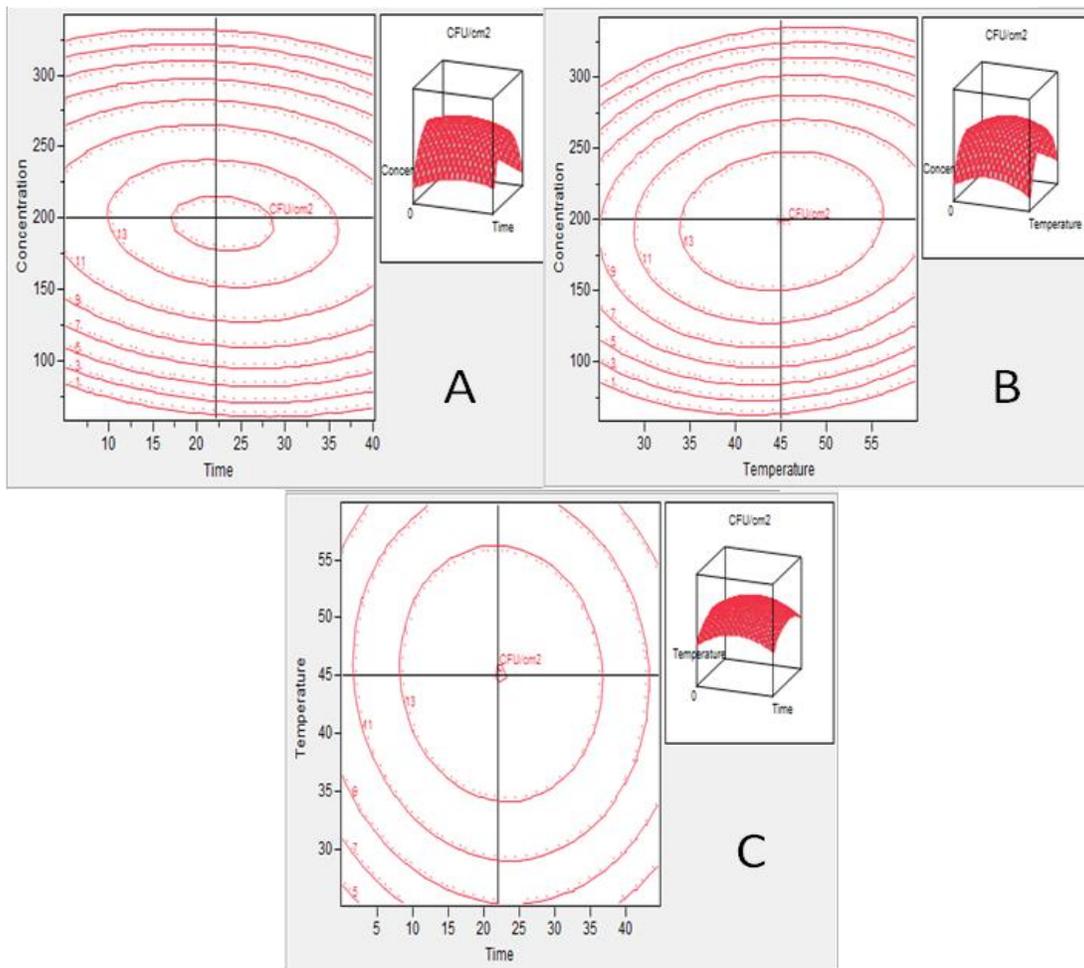
De donde X1 es el tiempo de exposición (10, 20 o 30 minutos); X2 es la concentración del AE alcalina (100, 200 o 300 ppm); X3 es la temperatura del lavado con el AE alcalina (30, 40 o 50°C); y X4 es la modificación superficial, sin modificación o con modificación superficial (electropulido). La variable respuesta (y) es el número de UFC por centímetro cuadrado después del lavado y desinfección.

La interpretación de estos resultados es complicada por la significancia de los factores principales y de algunas interacciones dobles, por lo que se analizaron las curvas de superficie respuesta, las cuales ofrecen información del cambio de la respuesta por la interacción entre dos factores a la vez. Dado que el factor de modificación es significativo se tienen que analizar las curvas por separado para cada nivel de este factor, es decir se analizaron las curvas de cada una de las interacciones dobles para las placas pulidas y para las placas electropulidas por separado.

En la figura 18 se muestran las graficas de superficie respuesta para las placas pulidas. Para la curva de tiempo-concentración (Figura 18 A) se observa que la respuesta cae disminuye más rápido en el eje de la concentración, comparado con la caída en el eje del tiempo. El punto de mayor respuesta para estos dos factores es 22 minutos y 200 ppm de AE alcalina. El intervalo donde se tiene una respuesta muy cercana a la mejor es de 16 a 28°C minutos y de 179 a 218 ppm de AE alcalina.

Para la interacción de tiempo-temperatura (Figura 18 B) se observa que disminución en ambos ejes no es tan pronunciada, como en el caso anterior. Las

coordenadas del punto donde la respuesta es mejor es de 22 minutos y 45°C, el intervalo donde la respuesta no se aleja de este punto es entre los 16 a 30 minutos y de 38 a 50°C. En cuanto a la grafica de Temperatura-concentración el intervalo de la temperatura es amplio, lo cual coincide con lo observado en la grafica, este intervalo va de 37 a 52°C. En el eje de la concentración el intervalo donde la respuesta está cerca es mejor es de entre 165 a 230 ppm de AE alcalina. Los valores en los cuales se da la mejor respuesta son, para la temperatura 45°C y para la concentración 198 ppm.



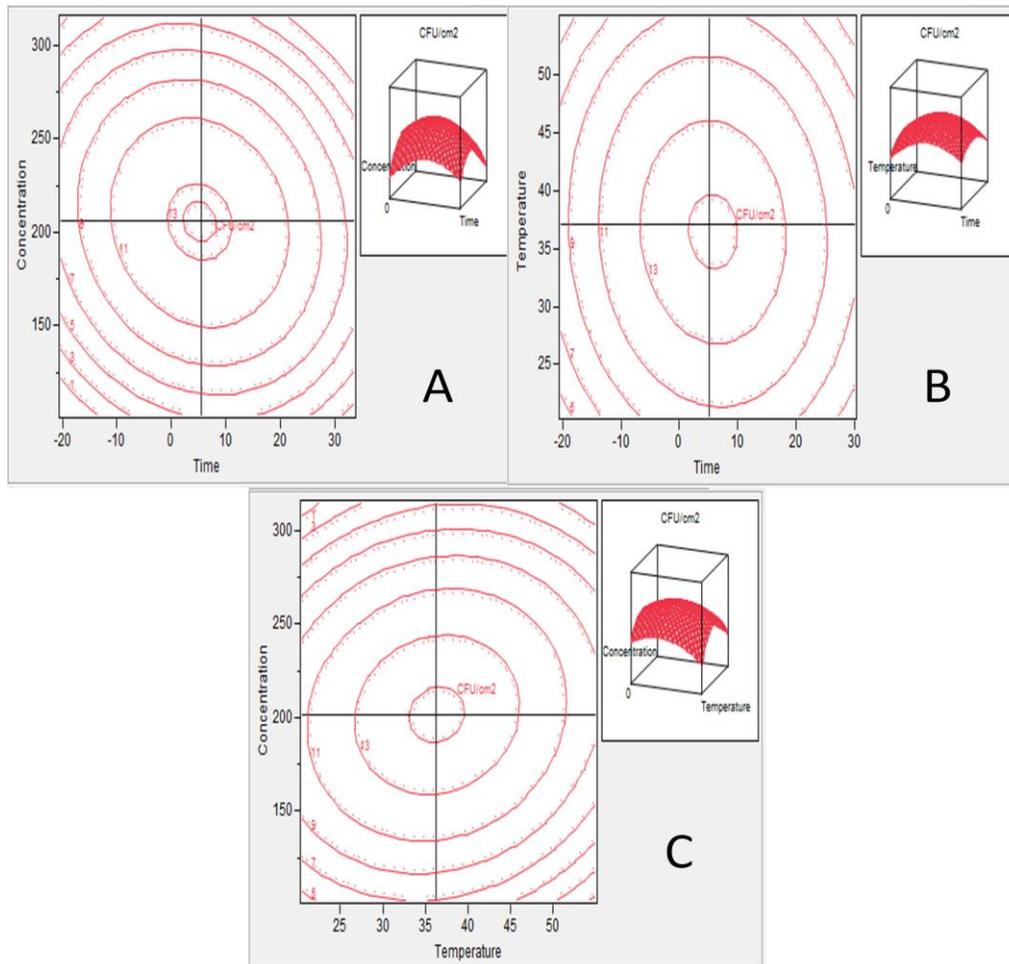
**Figura 18:** Gráficas de superficie respuesta para las placas pulidas, A) Tiempo-concentración; B) Temperatura-concentración; C) Tiempo-temperatura.

Si se juntan los intervalos para las tres curvas de superficie repuesta para las placas pulidas se obtiene un intervalo donde la respuesta no está alejada de mejor tratamiento y el tratamiento donde se predice la mejor respuesta para la limpieza y desinfección de las placas pulidas. El mejor tratamiento para las placas sin pulir está definido por los valores de 22 minutos, 200 ppm de concentración de AE alcalina y 45°C. Aún cuando no sea posible trabajar bajo estas condiciones, es posible usar las condiciones más cercanas sin sacrificar tanto la respuesta, y están dados por los intervalos antes mencionados, los cuales van de 20 a 28 minutos; de 179 a 218 ppm de AE alcalina; y de 38 a 50°C para las placas de acero inoxidable 304-2B.

Las graficas para las placas electropulidas se presentan en la figura 19, donde la grafica de Tiempo-concentración (Figura 19 A), muestra que la caída de la curva sobre el eje del tiempo tiene una caída más suave, en comparación con la caída del eje de la concentración. Se puede interpretar como que el tiempo es menos sensible a los cambios, en comparación con la concentración. El punto en el que se da la mejor respuesta está dado por las siguientes coordenadas: 5 minutos y 206 ppm de AE alcalina. En la grafica de Tiempo-temperatura (Figura 19 B) se observa que los dos factores muestran una pendiente suave en ambos ejes, las mejores condiciones están definidos por los siguientes valores: 5 minutos y 37 °C para el tiempo y la temperatura. En el caso de la grafica de Temperatura-concentración (Figura 19 C) la pendiente de esta curva, para el eje de la concentración es mayor en comparación de la que muestra el eje de la temperatura. El punto óptimo para esta interacción está en los valores de 36°C y 201 ppm de AE alcalina. El intervalo de estos valores en los cuales se pueden mover sin menoscabo de la respuesta son, para la temperatura de 31 a 41°C y para la concentración entre 179 y 222 ppm.

Los valores que determinan el mejor tratamiento son 5 minutos; 203 ppm de AE alcalina a 37°C. Este tratamiento puede moverse en los intervalos dados por

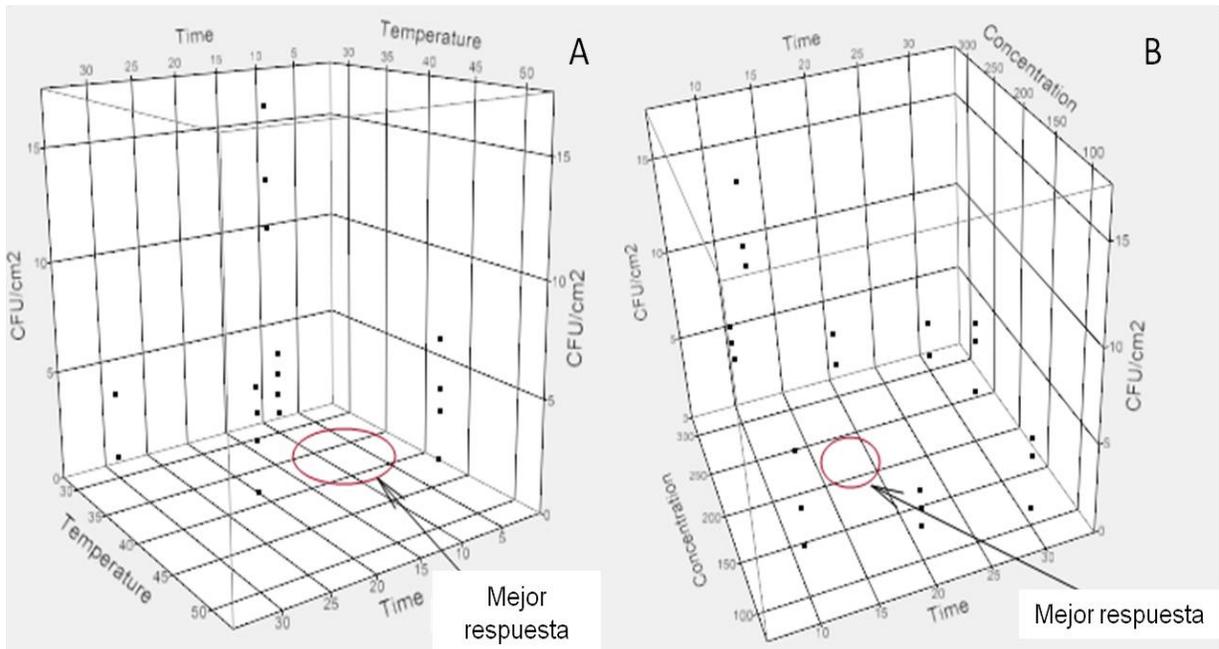
los siguientes valores, para el tiempo de 2 a 8 minutos; para la concentración de 195 a 214 ppm; y para la temperatura de 32 a 40°C.



**Figura 19:** Gráficas de superficie respuesta para las placas electropulidas, A) Tiempo-concentración; B) Tiempo-temperatura; C) Temperatura-concentración

Para verificar que el diseño es aceptable y que predice los resultados adecuadamente se realizó una grafica con tres ejes (Figura 20), dos están definidos por los factores principales y el tercero es la variable respuesta. Para las placas pulidas (Figura 20 A) se observa que la zona predicha por el modelo está alejada de la zona donde la población microbiana en UFC/cm<sup>2</sup> es alta y por tanto esta cerca de los tratamientos donde la reducción fue mayor. El gráfico para las placas electropulidas (Figura 20 B) muestra lo mismo que la grafica anterior, es

decir que la zona predicha por el modelo está alejada de los tratamientos con una reducción menor. Con esto se puede concluir que el modelo se ajusta a los resultados y lo predicho por este es confiable.



**Figura 20:** Grafica 3D para las placas de acero inoxidable A) pulidas; y B) electropulidas

Para confirmar los resultados se realizaron pruebas confirmatorias (Tabla 11), para esto se llevaron a cabo los dos mejores tratamientos, obtenidos de las graficas de superficie respuesta y dos tratamientos del diseño experimental seleccionados al azar, pero cumpliendo la característica de que hayan presentado una alta reducción de la población microbiana sobre la superficie de las placas.

**Tabla 11:** Tratamientos confirmatorios para el diseño óptimo

Tratamiento	Tiempo (s)	Concentración (ppm)	Temperatura (°C)	Modificación	Respuesta (UFC/cm <sup>2</sup> )
1	22	200	45	Sin	0.4
2	5	200	35	Con	0.5
8	30	100	30	Sin	3.6
6	10	300	30	Con	1.7

Dado que en estos tratamientos confirmatorios se obtuvieron buenas reducciones de población microbiana, se puede concluir que lo predicho por el modelo se ajusta a lo observado. Los mejores tratamientos tienen una reducción de alrededor de  $10^3$  y  $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> para las placas sin pulir y para las placas electropulidas, respectivamente. Además los tratamientos del diseño experimental muestran resultados semejantes a los reportados en la tabla 10.

**Tabla 12:** Tratamientos realizados con el AE neutra del CIDETEQ

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>Concentración (ppm)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Modificación</b>	<b>Respuesta (UFC/cm<sup>2</sup>)</b>
<b>1</b>	22	200	45	Sin	0.8
<b>2</b>	5	200	35	Con	1.2
<b>8</b>	30	100	30	Sin	7.2
<b>6</b>	10	300	30	Con	2.4

Se realizaron estas mismas pruebas confirmatorias, utilizando la otra fuente de AE neutra proveniente del CIDETEQ, así como también se llevó a cabo la determinación de su actividad antimicrobiana. Estos resultados se muestran en la tabla 11, se observa que la reducción obtenida con el AE neutra del CIDETEQ y la comercial Desy® son similares, tanto en los mejores tratamientos como los predichos por el diseño óptimo. Por lo observado en las graficas de actividad antimicrobiana se esperaría que la reducciones fueran mayores a las presentadas, esto no fue lo que se observo en los resultados obtenidos. Estas diferencias se pueden deber a la presencia de la materia orgánica de la leche, ya que esta materia orgánica interfiere en la actividad del AE neutra y reduce su efectividad. Por otro lado en la actividad antimicrobiana se observa que la reducción dada por el AE neutra del CIDETEQ, es en un menor tiempo. En posible que se pueda estudiar estos tratamientos pero variando el tiempo de contacto.

Ayebah y colaboradores en el 2006, demostraron que al realizar una limpieza con AE alcalina y una desinfección con AE ácida hay una reducción de

alrededor de 4 y 5 logaritmos tanto en células libres como en biopelículas formadas por *Listeria monocytogenes* en presencia de materia orgánica. En ausencia de materia orgánica esta reducción aumenta por arriba de los 6 logaritmos después de un minuto de tiempo de contacto. Esta diferencia se debe a que la materia orgánica baja el potencial Redox de la solución, además de reducir la concentración de cloro residual, por lo que la actividad antimicrobiana del AE ácida disminuye cuando aumenta la concentración de materia orgánica. Los autores mencionan también que la actividad antimicrobiana aumentó al incrementar el tiempo de contacto.

Esto concuerda con lo observado en el presente estudio, ya que la reducción mostrada por el AE neutra es de alrededor de 4 logaritmos, tanto para el AE Desy® como para la del CIDETEQ. Por lo que, estos nuevos agentes de limpieza y desinfección pueden ser utilizados para sustituir a los agentes tradicionales, ya que presentan una mayor eficiencia de limpieza y desinfección de superficies. Además, no presentan los riesgos asociados como en caso de ácidos y álcalis fuertes. Es importante resaltar el uso secuencial del AE alcalina seguida del AE neutra, ya que de esta forma es cuando presenta una mayor actividad y eficiencia. Por otro lado, cabe resaltar que se disminuye el consumo de agua al eliminar los enjuagues intermedios para retirar los residuos de los agentes de limpieza y desinfección, con lo que se puede considerar como un procedimiento más ecológico y amigable con el ambiente.

## 6. CONCLUSIONES

El electropulido propició una reducción en la rugosidad promedio de 30 nm, con lo que se obtuvo una superficie sin una diferencia importante entre las crestas y valles presentes. Esta característica es importante, ya que al no presentar nichos de protección para la materia orgánica o para los microorganismos se puede evitar la formación de incrustaciones de grasa o proteínas, la formación de formas de resistencia como las biopelículas bacterianas.

La actividad antibacteriana mostrada por el AE neutra Desy® y la proporcionada por el CIDETEQ se puede considerar como buena, ya que logran una reducción en la población de microorganismos de la muestra de alrededor de 7 y 8 logaritmos, respectivamente, a los 30 segundos de contacto y a una concentración de 10 ppm de cloro residual para ambas AE neutras. Esta actividad antibacteriana sigue siendo aceptable aun con la presencia de materia orgánica de la leche, ya que de las placas se recuperaron pocas células de las placas de acero inoxidable.

La mezcla de microorganismos utilizada en este trabajo mostro una capacidad limitada de adhesión, ya que el nivel de células recuperadas fue bajo. Una posible causa es la topografía de las placas, debido a que las placas sin pulir pueden ofrecer refugio para las bacterias en las rugosidades y defectos, al contrario de las placas electropulidas, de las cuales se recuperó alrededor de un ciclo logarítmico de diferencia, por otro lado, para mejorar la recuperación de los microorganismos adheridos sobre la placa de acero inoxidable se podría probar otro procedimiento de recuperación.

Los factores principales del diseño óptimo que fueron significativos son el tiempo, la modificación superficial y la concentración del AE alcalina, también las interacciones dobles entre el tiempo de exposición y la modificación superficial, y la de la temperatura del lavado y la modificación superficial resultaron

significativas, además del factor cuadrático de la concentración del AE alcalina. El modelo propuesto para el diseño experimental óptimo fue significativo ( $p < 0.05$ ), ya que se ajusta a los resultados y la predicción del mismo es confiable. Los tratamientos predichos por el modelo con una mejor respuesta son: para las placas pulidas es 22 min, 200 ppm de AE alcalina y 45 °C; para las placas electropulidas es 5 minutos, 203 ppm de AE alcalina y 37 °C. Estos tratamientos fueron utilizados para realizar pruebas confirmatorias y los resultados mostraron una reducción similar a los obtenidos con aquellos tratamientos con una mejor respuesta, es decir alrededor de una célula por centímetro cuadrado.

El proceso de lavado y desinfección secuencial alternativo, utilizando agua electrolizada alcalina y neutra, propuesto en este trabajo puede remplazar a los utilizados actualmente en la industria, ya que presenta una alta efectividad en la remoción de materia orgánica y bacterias adheridas a la superficie de acero inoxidable, independientemente de las características de la superficie siempre y cuando se haga la corrección del tiempo de contacto.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aider** Mohammed, Gnatka E., Benuli M., Pluthakhin G., Kastyuchik A., **2012**. Electro-actived aqueous solutions Theoy and application in the food industry and biotechnology. Innovative Food Science and Emerging Technologies 15:38 – 49.
- Al-Haq**, M. I., Sugiyama, J, Isobe S. **2005**. Applications of electrolyzed water in agriculture and food industries. Food Sci. Technol. Res. Int. 11:135.150.
- Andrade** Araujo E., Andrade Nelio J., Mendes da Silva L. H., Fernandez de Carvalho A., Sá Silva C. A., Mota Rams A., **2010**. Control of microbial adhesion as a strategy for food and bioprocess technology. Food Bioprocess Technol, 3:321 – 332.
- Arevalos-Sánchez** M., Regalado C., Martin S. E., Domínguez-Domínguez, García-Almendárez B. E., **2012**. Effect of neutral electrolyzed water and nisin on *Listeria monocytogenes* biofilms, and on listeriolysin O activity. Food Control, 24, 116 -122.
- Ayebah** Beatrice, Hung Yen-Con, Frank Joseph, **2005**. Enhancing the bactericidal effect of electrolyzed water on *Listeria monocytogenes* biofilms formed on stainless steel. Journal or Food Protection, 68, 7:1375-1380.
- Ayebah** Beatrice, Hung Yen-Con, Kim Chyer, Frank Joseph F., **2006**. Efficacy of electrolyzed wáter in the inactivation of planktonic and biofilm *Listeria monocytogenes* in the presence of organic matter. Journal of Food Protection, 69, 9: 2143-2150.
- Bove** F., Shim Y., Zeitz P., **2002**. Drinking water contaminants and diverse pregnancy outcomes: A review. Environmental Health Perspectives. 110, 1: 61-74.
- Cao** L., Jones A. K., Sikka V. K., Wu J., Gao D., **2009**. Anti-icing superhydrophobic coating. American Chemical Society. DOI: 10.1021/1a902882b.
- Chi** Cheng Lin, Chi Chang Hu, **2008**. Electropolishing of 304 stainless steel: surface roughness control using experimental design strategies and a summarized electropolishing model. Electrochimica Acta 53, 3356-3363.

- Deza** M. A., Araujo M., Garrido M. J., **2003**. Inactivation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella enteritidis and Listeria monocytogenes on the surface of tomatoes by neutral electrolyzed water, Letters in Applied Microbiology, 37: 482-487.
- Deza**, M. A., Araujo, M. y Garrido, M.J. **2005**. Inactivation of Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus on stainless steel and glass surfaces by neutral electrolyzed water. Lett Appl. Microbiol, 40: 341-346.
- Environmental Protection Agency (EPA), 1999**. Alternative disinfectants and oxidant guidance manual. Office Water, EPA 815-R-99-014, Estados Unidos.
- Feng** L., Li S., Li Y., Li H., Zhang L., Zhai J., Song Y., Liu B., Jiang L., Zhu D., **2002**. Super-hydrophobic surface: from natural to artificial. Adv. Mater. 14 24: 1857-1860.
- Gherna**, R. L. **1994**. Culture Preservation. En: methods for general and molecular bacteriology. Gerhardt P. Murray R.G.E, Wood W.A y Krieg N.R. (Edts). American Society for Microbiology. Washington, 12: 278-292
- Hall** Stoodley Luanne, Stoodley Paul, **2009**. Evolving concepts in biofilm infections, Cellular Microbiology, 11, 7: 1034–1043.
- Hilbert L. R.**, Bagge-Raun D., Kold J., Gram L., **2003**. Influence or surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. International Biodeterioration and Biodegradation, 52: 175- 185.
- Huang** Y. R., Huang Y. C., Hsu S. Y., Huang Y. W., Hwang P. F., **2008**, Application of Electrolyzed Water in the Food Industry, J. of Food Control, 19, 4: 329-345.
- Hoja** técnica Agua Activada DESY® BM, FIT-CC-002, **2011**.
- Hoja** técnica Agua Activada LIMY® BM, FIT. CC-005, **2011**.
- Issa-Zacharia** Abdulsudi, Kamitani Yoshinori, Miwa Nami, Muhimbula Happiness, Iwasaki Koichi, **2011**. Application of slightly acidic electrolyzed water as a potential non-thermal food sanitizer for decontamination of fresh ready-to-eat vegetables and sprouts. Food Control 22: 601-607.

- Issa-Zacharia** Abdulsudi, Kamitani Yoshinori, Muhimbula Happiness, Iwasaki Koichi, **2010**. Antimicrobial effect of slightly acidic electrolyzed water for inactivation of Salmonella spp. and Escherichia coli on fresh strawberries (Fragaria L.), African Journal of Microbiology Research, 4, 20: 2174-2180.
- Japakaset** Jantima, Stonsaovapak Siriporn, Charoenthawat Pornthip, Panthavee Wanchai, **2006**. Efficacy of electrolyzed–oxidizing water for inactivating Escherichia coli inoculated on holy basil, Kasetsart J. (Nat. Sci.), 40: 716–720.
- Jasso** Hinojosa René, **2008**. Procedimientos Estándares Operacionales en la Industria Alimentaria. Programa Universitario de Alimentos. UNAM.
- Jullien** C., Bénézech T., Carpentier B., Lebret V., Faille C., **2002**. Identification of surface characteristic relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. Journal of Food Engineering, 56: 77-87.
- Kosmač** Alenka, 2010. Electropulido de aceros inoxidables, Serie de Materiales y Aplicaciones, Volumen 11, Editor EuroInox.
- Latorre** A. A., Van Kessel J. S., Zurakowski M. J., Predhan A. K., Boor K. J., Jayarao B. M., Hourser B. A., Daugherty C. S., Schukken Y. H., **2010**. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with Listeria monocytogenes, J. Dairy Sci., 93: 2792-2802.
- Liao**, L.B., Chen, W.M., Xiao, X.M., **2007**. The generation and inactivation mechanism of oxidation–reduction potential of electrolyzed oxidizing water. J Food Eng 78: 1326–1332.
- Lopez** Victor Ignacio y Ramos Rogelio, **2007**. Una introducción a los diseños óptimos. Revista colombiana de estadística, 30, 1: 37-51.
- Mukhopadhyay** S., Ramaswany R., **2012**. Application of emerging technologies to control Salmonella in food: A review. Food Research International 45: 666-677
- Park** Hoon, Huang Yen-Con, Chung Donghwan, **2004**. Effects of chlorine and pH on efficacy of electrolyzed water for inactivating Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes, Journal of Food Microbiology, 91: 13-18.

- Rodriguez** Díaz Juan Manuel, **2001**. Criterios característicos en diseños óptimos de experimentos. Ediciones Universidad de Salamanca, Salamanca, España.
- Rosmaninho** R., Santos O., Nylander T., Paulsson M., Beuf M., Benezech T., Yiantsios S., Andritsos N., Karabelas A., Melo L. F., 2007. Modified stainless steel surface targeted to reduce fouling—evaluation of fouling by milk components. *Journal of Food Engineering*, 80: 1176 – 1187.
- Ren** Tingting, Su Yi-Cheng, **2006**. Effects of Electrolyzed Oxidizing Water treatment on reducing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in raw oysters, *Journal of Food Protection*, 69, 8: 1829–1834.
- Van Hecke** Benoit, **2006**. Los acabados mecánicos de las superficies decorativas de acero inoxidable, Serie de Materiales y sus Aplicaciones, volumen 6, Editor EuroInox.
- Walker** S. P., Demirci A., Graves R. E., Spencer S. B., Roberts R. F., **2005a**. Cleaning milking systems using electrolyzed oxidizing water, *American Society of Agricultural Engineers*, 48, 5: 1827–1833.
- Walker** Stephen P., Demirci Ali, Graves Robert E., Spencer Stephen B., Roberts Robert F., **2005b**. Response surface modelling for cleaning and disinfecting materials used in milking systems with electrolysed oxidizing water, *International Journal of Dairy Technology*, 58, 2: 65-73
- Zhao** Q., Liu Y., Wang C., Wang S., Müller Steinhagen H., **2005a**. Development and evaluation of Ni-Cu-P-PTFE composite coating to minimize microbial adhesion. In 6<sup>th</sup> International Conference on Heat Exchanger Fouling and Cleaning- Challenges and Opportunities. (Edits) Engineering Conferences International, Kloster Irsee, Germany. Vol. RP2, 17: 103-108
- Zhao** Q., Liu Y., Wang S., **2005b**. Surface modification of water treatment equipment for reducing CaSO<sub>4</sub> scale foration. *Desalination*, 180: 133-138.