

136

2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMEN DE PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

ONDAS DE CHOQUE DEBILES:  
UN NUEVO ENFOQUE EN LA  
ESTERILIZACION.

TESIS MANCOMUNADA  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A N :  
MARIA DE LOURDES ZAVALA TREJO  
ANGEL DANIEL SANTANA VARGAS



MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

258404



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

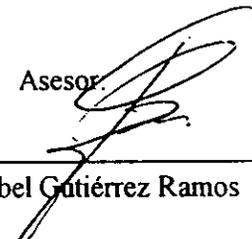
## JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. Rodolfo Pastelín Palacios  
Vocal: Prof. Ma. Elsa Escudero García  
Secretario: Prof. Abel Gutiérrez Ramos  
1er. Suplente: Prof. Rosa del Carmen Mateos Marcos  
2do. Suplente: Prof. Adriana Guadalupe Mejía Chávez

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Choques Débiles. Instituto de Física, U.N.A.M.

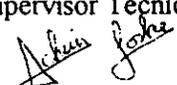
Asesor:



---

Q.F.B. Abel Gutiérrez Ramos

Supervisor Técnico:



---

Dr. Achim Max Loske Mehling

Sustentantes:



---

María de Lourdes Zavala Trejo



---

Ángel Daniel Santana Vargas

*Esta tesis está dedicada....*

A Paula

quien siempre me ha apoyado y a la que debo  
lo que tengo, la vida misma. Gracias.

A Graciela

por obsequiarme lo más valioso  
que tengo y contribuir a mi  
formación en todo momento

**A Luz María**

**por tener afecto y paciencia,  
y apoyarme siempre para  
vencer las dificultades**

**A Arturo y a Rocío  
por brindarme su apoyo y comprensión  
en todo momento.  
A ti por ser siempre mi ejemplo.  
A ti por enseñarme a no pensar en mi misma .**

A mami Mary

en quien ambos encontramos siempre un  
una sonrisa, un refugio o un buen consejo.

A Cecy  
por enseñarme a ver la vida con  
optimismo.

A Nety  
porque me ayudaste a librar  
muchos obstáculos.

A Miguel y Omar  
por ser como mis hermanos  
y enseñarme lo que significa el  
respeto ante todo.

No podemos olvidar a todos los que son también parte de nosotros y que de una y otra forma nos han dado un pedacito de su persona: Anita, Arturo, Cecilia, Claudine, Dalia, Diana, Dhory, Eduardo I., Eduardo P., Gerardo, Gina, Hugo, Manuel P., Manuel S., Miguel, Ricardo, Rocio, Sandra, Toño.

A todos aquellos  
que contribuyeron a nuestra formación profesional  
y a nuestro crecimiento como personas.

Maite Aztigarraga Zavaleta  
Alexandro Bonifaz Trujillo  
Rafael Castillo Bocanegra  
Ma. del Carmen Cortes Decoir  
Saturnino De León Chapa  
Juan José García Melo  
Raúl Garza Velasco  
Misael González Ibarra  
Abel Gutiérrez Ramos  
Alicia Gutiérrez Murillo  
Antonio Lee Chong  
Beatriz Luna Millán  
Catalina Montaña Mata  
Raúl Nieto Camacho  
Arturo Penilla  
Alma Lilia Peña Ramírez  
Ignacio Rodríguez  
Alfonso Sanabria  
Florencio

A todo el personal del Banco de Sangre del  
Hospital de PEMEX Picacho por haberme  
cedido su tiempo y paciencia  
y por brindarme su confianza.

A Lupita y a Irma quienes  
me ayudaron a superar tragos muy amargos  
y más que ser mis maestras se han convertido  
en mis amigas.

A Laura  
por ser mi guía profesional  
y amiga

A ti que con tu cariño y compañía has estado  
conmigo en todo momento, más que ser dos  
personas tal vez seamos uno mismo.

A ti mi compañera,  
que siembras algo nuevo todos los días  
que me invitas a crecer  
y a ser de ti, inborrable  
que estas en mi

---

---

## PRÓLOGO

---

La presente tesis fue desarrollada en su totalidad en el Laboratorio de Choques Débiles del Instituto de Física de la UNAM (IFUNAM), bajo la dirección de los doctores **Fernando E. Prieto** y **Achim M. Loske**, quienes fundaron el mencionado laboratorio y diseñaron y construyeron el generador de ondas de choque que se usó en los experimentos reportados aquí, formando las bases teóricas y experimentales para que actualmente sea posible hacer trabajos como el presentado aquí.

Cabe mencionar además, que el **Dr. Prieto** y el **Dr. Loske** generaron la idea de una posible técnica de esterilización de alimentos por ondas de choque, tema de esta tesis, en base a sus experiencias de más de diez años con la investigación en el campo de la aplicación de las ondas de choque débiles a la medicina.

Los resultados que se presentan aquí, forman parte de un ambicioso proyecto de investigación multidisciplinario del Laboratorio de Choques Débiles, parcialmente apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (proyecto DGAPA IN-502694).

La asesoría y supervisión en el área microbiológica estuvo a cargo del Q.F.B. Abel Gutiérrez Ramos del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM.

Dr. Fernando E. Prieto y Dr. Achim Loske

---

---

## AGRADECIMIENTOS

---

Queremos agradecer al Dr. Fernando E. Prieto y al Dr. Achim Max Loske Mehling el brindarnos su confianza para colaborar con este trabajo en el Laboratorio de Choques Débiles del IFUNAM, además de su apoyo, comprensión y paciencia a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Al Q.F.B. Abel Gutiérrez Ramos por su amistad, asesoría y contribución a nuestra formación profesional.

Además de las personas que forman parte del equipo de trabajo del laboratorio:

Al Q.F.B. Alejandro Camacho que inicialmente estuvo a cargo del área química de este laboratorio y quien nos invitó a participar en este proyecto.

A la Q.A. Marisol Cortés Saldaña por su colaboración en la parte experimental.

La operación del MEXILIT II estuvo a cargo del Sr. Eduardo Armenta Ruíz.

Agradecemos al Sr. Arturo Méndez su eficiente colaboración en el diseño, la construcción y el mantenimiento del generador de ondas de choque MEXILIT II, así como por la realización de los experimentos relacionados con las mediciones de presión.

Agradecemos también a todas aquellas personas que contribuyeron en este trabajo:

Al Sr. Alfredo Sánchez por su trabajo profesional en la elaboración de las diapositivas que forman parte de la documentación de este trabajo.

Al Dr. Jorge García quien hizo el análisis de las bolsas de protección en el espectrofotómetro.

Al Q.F.B. Arturo Zavala Trejo por sus críticas y comentarios a esta tesis.

A la D.G. Elba Rocío Zavala Trejo por la elaboración de las figuras presentadas en esta tesis.

---

---

# ÍNDICE

---

|                              | Pág. |
|------------------------------|------|
| 1. INTRODUCCIÓN .....        | 1    |
| 2. ESTERILIZACIÓN .....      | 4    |
| 2.1. Métodos físicos .....   | 5    |
| 2.1.1. Calor .....           | 5    |
| 2.1.1.1. Calor Húmedo .....  | 5    |
| Autoclave .....              | 5    |
| Tindalización .....          | 5    |
| 2.1.1.2. Calor Seco .....    | 7    |
| Horno .....                  | 7    |
| Incineración .....           | 8    |
| 2.1.2. Filtración .....      | 8    |
| Filtros de profundidad ..... | 9    |
| Filtros de membrana .....    | 9    |
| 2.1.3. Radiación .....       | 10   |
| Ultravioleta .....           | 10   |
| Ionizante .....              | 11   |
| 2.2. Métodos químicos .....  | 12   |
| 2.2.1. Gases .....           | 12   |
| Óxido de etileno .....       | 12   |

|  |    |
|--|----|
| Formaldehído .....   | 13 |
| Otros gases .....  | 13 |
| 2.2.2. Líquidos .....                                      | 14 |
| Glutaraldehído .....                                       | 14 |
| Peróxido de hidrógeno .....                                | 15 |
| Ácido peracético .....                                     | 15 |
| 2.3. Métodos en investigación .....                        | 15 |
| 3. ONDAS DE CHOQUE DÉBILES (OCD) .....                     | 17 |
| 3.1. Conceptos generales .....                             | 17 |
| 3.2. Métodos de generación .....                           | 21 |
| 3.3. Aplicaciones de las ondas de choque .....             | 28 |
| 4. APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES EN MICROBIOLOGÍA. ...     | 30 |
| 4.1. Generalidades .....                                   | 31 |
| 4.2. Aplicación de altas presiones a microorganismos ..... | 32 |
| 4.2.1. Presiones estáticas .....                           | 32 |
| 4.2.2. Presiones dinámicas .....                           | 33 |
| 4.3. El Mexilit II .....                                   | 35 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS .....                                | 39 |
| 6. RESULTADOS .....  | 45 |
| 7. EN CAMINO A LA ESTERILIZACIÓN .....                     | 73 |
| 8. CONCLUSIONES .....                                      | 77 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA .....                                      | 79 |
| APÉNDICE .....   | 86 |

---

---

## 1. INTRODUCCIÓN

---

El acontecer diario del hombre está rodeado de fenómenos maravillosos e inexplicables que desde el inicio han transformado su existencia. A través de la historia, los sucesos cotidianos y cambios en su entorno lo han invitado a descifrar y conocer todo aquello que ha despertado su curiosidad, llevándolo a revelar hechos que van desde lo místico hasta lo científico. Dentro de su búsqueda interminable ha descubierto una forma de vida inimaginable y fantástica de seres microscópicos. El desarrollo técnico y científico mostró que estos seres eran los responsables de acciones como la descomposición de los alimentos, la fermentación de los vinos y el origen y transmisión de algunas enfermedades.

La microbiología se encarga del estudio de los microorganismos, su naturaleza, sus actividades y la relación con el hombre, los animales, las plantas y entre ellos mismos. Parte importante de su investigación abarca el control de las diversas poblaciones microbianas, para lo cual es fundamental poseer un conocimiento vasto sobre las características y condiciones de crecimiento, atributos particulares y hábitats.

Todo proceso en el que intervienen microorganismos involucra invariablemente una etapa de esterilización. La esterilización es un término absoluto y significa la inactivación total de todas las formas de vida microbiana en términos de la capacidad del microorganismo para reproducirse<sup>57</sup>. Los métodos actuales, ya sean físicos o químicos, resultan eficaces pero no son aplicables en todos los casos. La Industria Alimentaria es un ejemplo en el que se necesitan crear procedimientos que, de ser posible, esterilicen los alimentos, logren aumentar su tiempo de conservación o destruyan microorganismos difíciles de eliminar con los métodos vigentes.

En las últimas décadas, grupos de investigadores han probado metodologías alternas, que si bien han arrojado resultados alentadores, ninguna ha tenido la contundencia para implementarse como técnica aprobada y, por lo tanto, desplazar a las convencionales.

Mucho de lo experimentado hasta hoy se encamina hacia el desarrollo de principios que parecían no tener relación alguna con la forma tradicional de esterilización. Las nuevas propuestas se fundamentan en conceptos como energía ionizante<sup>38</sup>, oscilaciones magnéticas, descargas eléctricas, tratamientos con altas presiones estáticas<sup>17,19</sup>, pulsos de luz intensa<sup>34</sup> y ondas sonoras<sup>15</sup>, sin embargo, los resultados hasta la fecha sólo perfilan a la mayoría como métodos de conservación<sup>9,35</sup>.

Es importante señalar que el presente trabajo es un estudio preliminar que utiliza un método de generación diferente al empleado en el único caso de experimentación similar<sup>39,49</sup>.

Las ondas de choque pueden ser producidas de diversas formas, en este caso se hizo con un generador electrohidráulico denominado Mexilit II. Lo anterior se refiere a que se produce una onda de choque por rompimiento eléctrico entre dos electrodos sumergidos en agua, misma que es dirigida mediante un reflector a un lugar específico en el cual se ubica la muestra a tratar con la posibilidad de observar un efecto letal.

En los capítulos siguientes explicaremos los pormenores de la parte experimental, daremos a conocer los primeros resultados, así como las posibilidades de este proyecto para cumplir nuestro objetivo y obtener un conocimiento más profundo sobre la interacción de las ondas de choque débiles con los microorganismos, analizando las variables que pusimos a experimentación así como una evaluación total de la metodología.

Entre los objetivos que deseamos alcanzar al finalizar este estudio se encuentran:

- Dar a conocer los fundamentos de las ondas de choque, su definición, representación, interacción con el medio.
- Describir las características del equipo empleado (Mexilit II).
- Presentar resultados preliminares obtenidos con un microorganismo de referencia.

- Establecer las bases teóricas y experimentales con las cuales se puede dar un seguimiento al desarrollo completo de la técnica.
- Implementar esta técnica como método de esterilización.
- Proponer un panorama general de aplicación futura de las ondas de choque.

---

---

## 2. ESTERILIZACIÓN

---

Mucho tiempo antes del descubrimiento de los microorganismos se puso en práctica diversos métodos para evitar la descomposición de alimentos y la transmisión de enfermedades con el único propósito de retirar todo aquello que le ocasionaba daño al ser humano.

Algunas de las aportaciones que revolucionaron el campo microbiológico y que están directamente relacionadas con el concepto de esterilización, comenzaron en el siglo XVIII con científicos como Joblot, que en 1718 mostró que podía esterilizar una infusión hirviéndola por 15 minutos y luego sellándola en un contenedor. Nicolas Appert aplicó este principio para procesar comida enlatada en 1810; en 1875 Lister usó por primera vez los métodos de asepsia en cirugía; en 1878 Pasteur introdujo el concepto de infección; en 1881 Koch preparó el primer medio sólido para el cultivo de gérmenes agregando gelatina al caldo de carne<sup>4</sup>.

Los procedimientos actuales retoman parte de los conceptos empleados por sus fundadores. La preparación de medios de cultivo hecha por Koch atrajo de forma indirecta la necesidad de crear métodos que eliminaran todo agente contaminante que pudiera interferir en el estudio de los microorganismos.

La esterilidad es un término absoluto y se refiere a que un objeto será considerado estéril sólo cuando sea completa la ausencia de microorganismos viables<sup>52</sup>. La esterilización no debe confundirse con procesos como desinfección, sanitización, pasteurización, asepsia u otros, cuyo objetivo es el de inactivar o matar microorganismos pero no necesariamente toda la población microbiana<sup>4</sup>.

La esterilización es una práctica diaria en los laboratorios microbiológicos, quirófanos y plantas de producción de alimentos. Los métodos que se utilizan para este fin pueden clasificarse como: métodos físicos y métodos químicos.

## **2.1. MÉTODOS FÍSICOS**

Los microorganismos necesitan ciertas condiciones para sobrevivir. La temperatura, el pH, la humedad, la presión, las cantidades de oxígeno y nutrientes son factores que pueden promover o limitar su existencia. La mayoría poseen una tolerancia a variaciones extremas en su medio ambiente físico y poca probabilidad de subsistir fuera de su hábitat<sup>57</sup>.

Aprovechando este principio se han creado métodos en los que se toma en cuenta la susceptibilidad de los microorganismos a agentes como: temperatura, humedad, presión, radiación y efectos mecánicos.

### **2.1.1. Calor**

Existen principalmente dos formas de esterilización térmica: calor húmedo y calor seco. El mecanismo de acción es por desnaturalización, coagulación, pérdida de integridad de la membrana y oxidación de componentes vitales del microorganismo, respectivamente.

#### **2.1.1.1. Calor húmedo**

El calor húmedo se caracteriza por ser un proceso rápido que emplea poca energía. Se utiliza para esterilizar todo tipo de objetos, excepto aquellos que pueden ser dañados por temperaturas elevadas, o bien, aquellos en los cuales la humedad acelera su deterioro físico.

La esterilización por calor húmedo puede tener dos formas: vapor a presión (autoclave) y tindalización.

## Autoclave

El proceso de esterilización se lleva a cabo dentro de un contenedor para presión, denominado autoclave. El objeto a esterilizar debe estar en contacto con el vapor saturado a presión, temperatura y tiempo específicos.

Un autoclave es básicamente una cámara de metal con válvulas de alimentación y salida de vapor y agua, termómetros, manómetros, dispositivos electrónicos y una compuerta de seguridad. El material con el cual se construye debe resistir por tiempos prolongados y con buen margen de seguridad las condiciones de la esterilización, esto es, resistir condiciones altamente oxidantes para metales, la presión y temperatura elevadas y el uso frecuente. Generalmente se esterilizan en autoclave medios de cultivo, soluciones cuyos componentes no se descomponen con el calor, soluciones dentales, guantes de goma, textiles, etc.

Existe una relación bien conocida entre la temperatura y el tiempo necesario para que el proceso sea confiable, por ejemplo; para esterilizar líquidos y materiales análogos se mantiene 30 minutos a 115°C (10 lb de presión de vapor/pulg<sup>2</sup>) o 15 minutos a 121°C (15 lb de presión de vapor/pulg<sup>2</sup>)<sup>52</sup>, sin contar el tiempo necesario para alcanzar tales condiciones. Las especificaciones están sujetas a modificaciones en función de la cantidad de material a esterilizar en un solo ciclo, o bien, de la carga y del fabricante del aparato.

El mecanismo de esterilización es la desnaturalización y coagulación de las proteínas de los microorganismos<sup>57</sup>.

## Tindalización

Este método se utiliza para esterilizar ciertos líquidos y semisólidos que son descompuestos o destruidos con facilidad por el calor. Consiste en calentar el material a esterilizar de 80 a 100°C por 20 a 45 minutos por tres días consecutivos con el adecuado almacenamiento a temperatura ambiente. Las células vegetativas, bacterias y algunas esporas son eliminadas en el primer día del proceso, las esporas sobrevivientes son activadas por el calor y destruidas al segundo o tercer ciclo de calentamiento. Este método de esterilización

fraccionada es útil para esterilizar medios de cultivo con constituyentes como carbohidratos, suero o huevo<sup>4,57</sup>.

### 2.1.1.2. Calor seco

La esterilización por calor seco es un método que se usa con mayor frecuencia por ser más seguro y confiable que la esterilización por calor húmedo, ya que no utiliza vapor ni trabaja con altas presiones; sin embargo, la razón por la cual su empleo se ha visto restringido, en los casos en que es indistinto emplear calor húmedo o seco, es debido a que requiere temperaturas por encima de los 180°C y tiempos de aproximadamente 2 horas, lo cual implica un gasto energético mayor. El efecto letal se presenta como resultado del calor que es conducido por el material a esterilizar, con el cual los microorganismos están en contacto<sup>4</sup>.

La distribución de calor puede ser por convección, empleando un horno de aire caliente o por transferencia directa empleando la incineración<sup>52</sup>.

### Horno

Los objetos que pueden esterilizarse con este método, son aquellos que por ser densos o impermeables la penetración del vapor dentro de un autoclave es casi nula y por lo tanto, las condiciones necesarias para lograr la esterilización por calor húmedo no pueden alcanzarse en el corto tiempo al que son expuestos, además de los materiales que sufren algún tipo de corrosión por la humedad.

Como ejemplo de los objetos que pueden esterilizarse con este método se encuentran: vasos, jeringas, agujas, bisturíes, tijeras, fresas, cristalería, herramientas quirúrgicas y dentales, prendas de algodón, aceites, polvos y ceras.

Actualmente los hornos son eléctricos y están dotados de termopares para registrar la uniformidad de temperatura en todas sus zonas y de un ventilador para distribuir el aire caliente. La carga debe tener espacios entre los objetos a esterilizar para que circule el aire y estar tapados o sellados al igual que en el autoclave para evitar su recontaminación al terminar el ciclo.

Cada ciclo inicia cuando la temperatura deseada se alcanza y se mantiene por un tiempo determinado: para temperaturas de 150-160°C se requieren 2 horas, para 180°C 30 minutos. El primero se considera equivalente a esterilizar por calor húmedo a 121°C 15 minutos.

### Incineración

La incineración es el método de elección para esterilizar materiales que no deben ser reutilizados y, que además, debe asegurarse su destrucción total, como los desperdicios provenientes de laboratorios médicos y hospitales que contienen microorganismos potencialmente infecciosos.

El tratamiento conlleva la combustión de toda la materia orgánica a temperaturas entre 600 y 1000°C, reduciéndola a cenizas y gases. Actualmente se cuenta con incineradores especialmente diseñados para este fin. Otra forma más sencilla de incineración empleada de manera rutinaria en el laboratorio de microbiología, es pasar las asas y otros instrumentos pequeños por la flama de un mechero.

### **2.1.2. Filtración**

La filtración es un método útil para esterilizar líquidos y gases cuyos componentes son lábiles a otros tratamientos, principalmente al calor. No requiere de calentamiento, agentes químicos o radiación y el riesgo para el operador es casi nulo. El filtro es un dispositivo con poros de diferentes tamaños, diseñados para impedir el paso de microorganismos y partículas de mayor tamaño, el cual permite el paso de líquidos o gases a través de él. La efectividad del método depende del tamaño del poro, del material y del mecanismo de filtración<sup>52</sup>.

Existen dos tipos principales de filtros<sup>4</sup>:

- Filtro de profundidad.
- Filtro de membrana.

## Filtro de profundidad

Este tipo de filtro fue introducido en 1884 en Francia por Pasteur y Chamberlin. Consistía de un tubo de cerámica relleno de arcilla y arena. Pocos años después este tipo de filtro, de la marca alemana Seitz fue hecho de fibras de asbesto y posteriormente de fibras de lana de vidrio, asbestos y algodón. Los filtros de profundidad dependen poco del tamaño de poro, su función se supedita a la forma y al contorno irregular de las fibras y a las fuerzas electrostáticas de las partículas adheridas a las mismas, en las cuales las bacterias quedan atrapadas. El volumen total del poro es apenas el 20-30% del filtro, lo cual hace que tenga poca resistencia al flujo. Se utilizan para esterilizar aire y gases comprimidos. Su utilidad en líquidos se ve reducida a emplearlos como prefiltros.

## Filtros de membrana

Los filtros de membrana se utilizaron a partir de 1922, aunque su uso se generalizó después de varias décadas. Los materiales utilizados en su fabricación son polímeros como nitrocelulosa, nylon, dacrón, teflón y malla de acero inoxidable. El tamaño de poro requerido para excluir bacterias es de  $0.2 \mu\text{m}$ , y para virus y mycoplasmas de  $0.01-0.1 \mu\text{m}$ . El tamaño de algunas bacterias va de  $0.3$  a  $1 \mu\text{m}$  de diámetro y el de los virus va desde  $0.02$  hasta  $0.1 \mu\text{m}$  y algunos hasta  $0.25 \mu\text{m}$ . Los filtros de membrana se tapan con facilidad, ya que atrapan todas las partículas que son mayores al tamaño de los poros, formando películas superpuestas, por lo cual es necesario anteponer filtros con tamaños de poro mayores o bien filtros que no dependan del tamaño de poro, como los filtros de profundidad, para evitar que la membrana se sature con partículas del medio y dificulte la retención de los microorganismos. Los usos que generalmente se les dan es para esterilizar soluciones de uso farmacéutico, entre las cuales están las de uso oftálmico, parenterales, antibióticos, soluciones inyectables termolábiles, soluciones con carbohidratos e incluso soluciones intravenosas. También pueden utilizarse como pretratamiento de soluciones que deben estar libres de pirógenos y por lo tanto, deben esterilizarse por otros métodos, como los procesos de clarificación de vinos y remoción de levaduras.

En la esterilización del aire se pueden utilizar ambos tipos de filtros, los de filtración profunda, fibrosos y granulares, y toda la gama de filtros de

membrana. Los materiales fibrosos se empaquetan en contenedores bajo presión para evitar que se formen canales que reduzcan su eficiencia; el ancho del filtro es controlado con el mismo fin. Lo anterior obedece a la necesidad de crear espacios con el suficiente flujo de aire, el cual debe ser de alta pureza o estéril como el requerido en la aireación de antibióticos, medios de cultivo y fermentaciones, quirófanos, cuartos de pacientes inmunosuprimidos y áreas de producción de soluciones inyectables y algunos medicamentos en la industria farmacéutica o aire ultrapuro para salas de ensamble de componentes microelectrónicos como los empleados en las computadoras. Cabe destacar entre ellos los filtros HEPA (High-efficiency particulated air), cuya eficiencia es de 99.970-99.997%. Estos filtros retienen todo tipo de partículas suspendidas en el aire e incluso bacteriófagos de 0.05  $\mu\text{m}$ . El sistema de esterilización del aire puede conformarse por varios filtros HEPA auxiliados por aire de flujo laminar y lámparas de luz ultravioleta.

### **2.1.3. Radiación**

Parte de la radiación electromagnética que genera el sol tiene efecto bactericida. En la actualidad es de conocimiento popular que la luz ultravioleta causa daños en la piel y que la exposición a ésta debe ser controlada. Su acción puede ser controlada por diversos mecanismos naturales como la capa superior de ozono y las barreras mecánicas como el vidrio. Otro tipo de radiación, de menor longitud de onda, son los rayos X o los rayos gamma ( $\gamma$ ) y la producida por la desintegración radioactiva y por los aceleradores iónicos. La energía viaja en paquetes llamados cuantos; el número de cuantos absorbidos por un sistema biológico es igual al producto de la intensidad por la duración de la exposición, misma que puede tener la suficiente energía como para eliminar de manera completa un electrón de un átomo y producir una carga eléctrica (ionización) o sólo energía suficiente para llevar a los electrones a estados de mayor energía (excitación). La radiación que se utiliza con fines de esterilización es la ultravioleta o la ionizante<sup>57</sup>.

#### Ultravioleta

La luz ultravioleta causa excitación en los átomos dentro de una célula, particularmente en los ácidos nucleicos, causando mutaciones letales, esto tiene

íntima relación con su longitud de onda. El espectro más efectivo se encuentra comprendido entre longitudes de onda de 240 a 280 nm, siendo óptima a 260 nm, longitud de onda en la cual el ADN tiene una máxima absorción. Las mutaciones que produce, imposibilitan al microorganismo para reproducirse. La dosis esterilizante se calcula como producto de la intensidad por el tiempo de exposición y es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia desde donde se aplica.

La luz ultravioleta puede generarse artificialmente por medio de lámparas de vapor de mercurio. Los usos que pueden dársele son limitados debido a su bajo poder de penetración y baja energía. Sus principales aplicaciones son en la producción de agua purificada, y agua estéril para uso quirúrgico, para controlar infecciones transmitidas por aire en áreas cerradas como quirófanos y en el almacenamiento de carne, para evitar su descomposición.

### Ionizante

La radiación ionizante posee energía del orden de cientos a millones de veces mayores a la luz ultravioleta. Se clasifica en la que tiene masa y puede tener o no carga y la que es sólo energía. Para fines de esterilización, las de mayor valor práctico son los rayos  $\gamma$ , los rayos X y los electrones de alta energía (rayos  $\beta$ ). Su efectividad como agentes esterilizantes se debe a que tienen poder de penetración y pueden hacer blanco directamente con el ADN o producir iones activos o radicales libres que reaccionan indirectamente con los ácidos nucleicos.

Los rayos  $\gamma$  son totalmente confiables, ya que su generación es continua y al igual que los rayos X penetran los objetos, por lo que éstos pueden permanecer empacados durante y después de la esterilización. El tratamiento con este tipo de radiación puede durar horas, a diferencia del realizado con rayos  $\beta$ , el cual dura segundos y cuya única desventaja es su poca penetración. Las fuentes que generalmente se utilizan son isótopos como el  $^{60}\text{Co}$  para rayos  $\gamma$  y aceleradores de electrones para rayos  $\beta$ . El costo puede ser hasta diez veces menor para los aceleradores de electrones y no requiere de otras instalaciones costosas. La vida media del  $^{60}\text{Co}$  es de sólo 5.3 años y tiene la desventaja de que la fuente de  $^{60}\text{Co}$  representa un importante riesgo para la salud. La dosis esterilizante se mide en megarads (Mrad), que es la unidad de energía absorbida por gramo de material irradiado. Se considera efectiva una

dosis de 2.5 Mrad y se utiliza ampliamente para esterilizar algunas formas farmacéuticas y biológicas, en equipo de laboratorio, algunos plásticos y lana contaminada<sup>52</sup>.

## 2.2. MÉTODOS QUÍMICOS

La cantidad de sustancias químicas que se utilizan como esterilizantes en contraste con las que desinfectan es limitada, aún cuando tienen características comerciales como estabilidad, seguridad y falta de olor.

Pueden ser gases o líquidos. Los primeros tienen la capacidad de penetrar en materiales porosos, los segundos se aplican en superficies de objetos que son dañados por los gases.

Como en todos los procesos, las condiciones en que son empleados dependen de las necesidades del usuario y su efectividad está en función de la concentración del agente químico y del tiempo que se deje actuar.

### 2.2.1. Gases

Hace 60 años se le daba poco valor práctico al uso de este tipo de químicos, pues sus aplicaciones se restringían al tratamiento de superficies de aparatos y equipos. Es a partir de 1950 cuando se resuelve la necesidad de crear procedimientos para esterilizar materiales afectados por el calentamiento. La propuesta más económica y fácil de adoptar envolvió el uso de gases. Se diseñaron cámaras de contención comerciales, sin embargo, aún no se conocían las características tóxicas y carcinogénicas de algunos gases como el óxido de etileno.

#### Óxido de etileno

Los artículos que pueden esterilizarse con óxido de etileno incluyen endoscopios, instrumentos ópticos, equipo eléctrico y electrónico, catéteres

cardíacos, accesorios para microcirugías y materiales que pueden ser dañados por la temperatura. En las cámaras de óxido de etileno se requiere el cuidado y control simultáneo de varios parámetros interdependientes como concentración del gas, presión, temperatura, humedad relativa y tiempo de exposición. Cualquier desviación en esos parámetros puede comprometer el resultado deseado. Las desventajas de este químico son diversas: es un gas altamente tóxico con propiedades carcinogénicas, el proceso es más lento y, por lo tanto, más costoso que la esterilización con calor húmedo, los materiales deben ser aireados después del tratamiento, el gas puede ser flamable y explosivo.

El ciclo consiste en colocar el material a esterilizar en el autoclave y crear un ambiente saturado con el gas esterilizante. La cámara se llena con óxido de etileno a 10 lb por pulg<sup>2</sup> a 55°C por un período de 1.75 horas, al término del cual, el gas es removido de la cámara con aire estéril. Luego de un ciclo de aproximadamente 3.5 horas, las cámaras se abren y el contenido es transferido a un gabinete para su aireación a 55°C de 12 a 72 horas, lo cual es necesario para eliminar el óxido de etileno absorbido o disuelto en los materiales estériles<sup>4</sup>.

### Formaldehído

Este tipo de esterilización requiere de una cámara especial y el ciclo es parecido al del óxido de etileno. La concentración de formaldehído debe ser mayor a 5 g/L durante un período de 1 a 2 horas, en función de la cantidad de material a esterilizar.

Recientemente ha sido utilizado como esterilizante a bajas presiones de vapor para muchos de los instrumentos en los que se emplea la esterilización con óxido de etileno, siempre y cuando puedan tolerar la temperatura de trabajo (70 a 80°C). Esta temperatura no debe ser menor, ya que el formaldehído se polimeriza. Tiene un olor penetrante además de ser un agente tóxico.

### Otros gases

Entre los más importantes se encuentran la beta-propiolactona, el peróxido de hidrógeno y el ácido peracético.

La beta-propiolactona es un agente alquilante, cuya actividad es 4000 veces mayor que el óxido de etileno y 25 veces más efectivo que el formaldehído<sup>4</sup>. Se emplea a una concentración de 2 a 4 mg/L a 24°C y 70% de humedad relativa durante 2 horas; al igual que todos los gases, no penetra los sólidos, es tóxico y carcinógeno. Se utiliza para esterilizar grandes espacios.

El peróxido de hidrógeno en solución al 30% se vaporiza a 125°C. Se emplea de 3 a 4 segundos a 90°C para esterilizar superficies, dada su baja toxicidad, se perfila ampliamente dentro de industrias farmacéuticas, de alimentos y biotecnológicas.

El peróxido del ácido acético, o bien, ácido peracético se ha comprobado que en forma de vapor es un poderoso esterilizante, cuyas aplicaciones son muy parecidas a las del peróxido de hidrógeno.

### **2.2.2. Líquidos**

El consumo de líquidos como agentes esterilizantes es cada vez más frecuente, ya que son más económicos y presentan menos riesgos que los gases utilizados con el mismo fin. Todos los líquidos que esterilizan pueden emplearse como desinfectantes. Esto depende de la concentración, el tiempo de contacto, la temperatura y la interferencia de otras sustancias; sin embargo, no todos los desinfectantes pueden esterilizar, lo cual no depende de condiciones como las mencionadas con anterioridad, sino de la naturaleza del agente químico<sup>4</sup>.

#### Glutaraldehído

Es el único esterilizante frío, como también se le denomina, de gran eficacia recomendado por El Centro de Control de Enfermedades en Estados Unidos<sup>57</sup>. Se utiliza en solución al 2%, mantenida a un pH ácido para evitar su polimerización. Al momento de emplearlo se añade un activador que eleva su pH a 8-8.5 y el material a esterilizar (equipo de tratamiento respiratorio, material quirúrgico) se sumerge en la solución por aproximadamente 10 horas. Es más efectivo y menos tóxico que el formaldehído.

### Peróxido de hidrógeno

Se considera esterilizante a una concentración mayor al 20%. El aumento de temperatura, presencia de luz ultravioleta e iones de cobre estimulan su actividad. Es poco estable y altamente oxidante, por lo que su uso está restringido a objetos difíciles de corroer, además de ser irritante para los ojos y la piel. Se utiliza para esterilizar envases para leche, lentes de contacto suaves e implantes de resinas acrílicas, los cuales se sumergen en un baño por 6 horas.

### Ácido peracético

Se le considera un agente antimicrobiano más poderoso que el peróxido de hidrógeno, el glutaraldehído, el formaldehído y los gases como el óxido de etileno. Se utiliza como desinfectante en la industria de alimentos y como esterilizante en la experimentación con animales libres de gérmenes, en la industria farmacéutica para la esterilización en frío de emulsiones, hidrogeles, ungüentos y polvos. Para estabilizarlo se combina con peróxido de hidrógeno, ácido sulfúrico y ácido acético. Debido a que se descompone en éste último y en oxígeno, no causa toxicidad residual ni es peligroso para el medio ambiente.

## **2.3. MÉTODOS EN INVESTIGACIÓN**

Antes del comienzo de este siglo se efectuaron estudios enfocados hacia el control de los microorganismos en procesos que requerían ausencia total o la mínima población microbiana en diferentes industrias (alimentos, tratamiento de aguas residuales, farmacéutica, entre otros) utilizando métodos no fundamentados en la aplicación de calor o de sustancias químicas, pues dañaban las características de sus productos. La mayoría se emplearon en la industria alimenticia, pero la calidad de los materiales de empaque utilizados impidieron su aprovechamiento, originando el abandono casi total de la investigación en este campo. Fue hasta hace algunas décadas cuando éstos principios se retomaron y dieron origen a tecnologías alternativas que logran efectivamente inactivar a los microorganismos; sin embargo, aún están lejos de

lograr la esterilización en las industrias mencionadas y, por lo tanto, su uso se ha visto limitado a la conservación de alimentos.

Actualmente en el Instituto de Física de esta Universidad se estudia la factibilidad de una nueva tecnología que emplea ondas de choque débiles, buscando resolver los inconvenientes que presentan los métodos convencionales de esterilización. Una onda de choque débil es un pulso de presión muy corto que alcanza hasta aproximadamente 2000 atmósferas.

Las ondas de choque débiles se conocen desde principios de siglo, pero alrededor de 1960 se comenzó a investigar la posibilidad de desintegrar cálculos renales de forma no invasiva. En 1980 se hizo el primer tratamiento de litotripsia extracorporal usando un equipo con características comerciales<sup>29,42</sup>. La técnica se denomina litotripsia extracorpórea y los avances en este rubro se han extendido a la destrucción de cálculos biliares y salivales<sup>28,29,42</sup>. Otras aplicaciones clínicas más recientes se encuentran en el campo de la ortopedia<sup>54</sup>.

El resultado de la interacción y del efecto de las ondas de choque débiles sobre diferentes células<sup>46,41,8</sup> y tipos de cálculos son las bases de donde surgió en el Laboratorio de Choques Débiles del Instituto de Física de la UNAM la idea de iniciar este proyecto y de proponer a las ondas de choque como un método alternativo de esterilización.

---

### 3. ONDAS DE CHOQUE DÉBILES

---

Los avances tecnológicos y científicos nos permiten incursionar en diversas áreas que hasta hace algunas décadas permanecían inexploradas. Como ya se mencionó, el conocimiento de las ondas de choque se inicia a partir de este siglo. En 1950 se propusieron las primeras aplicaciones médicas en el campo de la litiasis. Alrededor de 1970 E. Häusler en Alemania concibió la idea de emplear a las ondas de choque para desintegrar cálculos renales en forma no invasiva y hasta los años 80's se aplicó por primera vez este principio en el tratamiento para humanos, para lo cual la compañía alemana Dornier Medizintechnik GmbH se construyó el HMI (Human Model 1)<sup>23,27,28</sup>. En los años siguientes se realizaron miles de tratamientos con aparatos similares, creándose centros de litotripsia en varios países<sup>23,29,42</sup>. Actualmente la litotripsia extracorporal por ondas de choque es el método de elección para tratar más del 80% de los cálculos renales y uretrales en todo el mundo, y en menor grado los cálculos biliares y salivales<sup>12</sup>.

Algunos grupos de investigación en el mundo tienen como tema de estudio la búsqueda de aplicaciones de las ondas de choque en campos diferentes a la litotripsia<sup>25,54</sup>. Sus intereses se encaminan al mejoramiento de las técnicas actuales<sup>30,43,44</sup> y a establecer un modelo que explique de forma clara su mecanismo de acción<sup>37</sup> y los efectos colaterales<sup>18, 28,31</sup>.

#### 3.1 CONCEPTOS GENERALES

Una onda es la propagación de energía a través de un medio, haciendo vibrar sus constituyentes con respecto a su posición de equilibrio, sin que éstos sufran un desplazamiento en la dirección del movimiento<sup>11</sup>.

Una onda de choque es una onda mecánica, lo cual quiere decir que necesita un medio líquido, sólido o gaseoso para propagarse. El término se refiere a una discontinuidad o pulso de presión que avanza por el medio y puede originar temperaturas muy elevadas en un instante, esto es, que la presión original del medio aumenta súbitamente al paso de la onda y después regresa gradualmente a su valor inicial. La denominación “débil”, en la expresión “ondas de choque débiles” (OCD), se emplea para indicar que las ondas generan presiones menores a 2 kbar<sup>26,27</sup>.

Existen algunos conceptos básicos que son importantes para comprender las características de una onda de choque, así como su generación. Entre ellos la frecuencia, la amplitud, la longitud de onda, el nodo, la cresta y el valle, todos relacionados con propiedades de movimientos ondulatorios, los cuales son mostrados de forma gráfica en la figura 3.1.

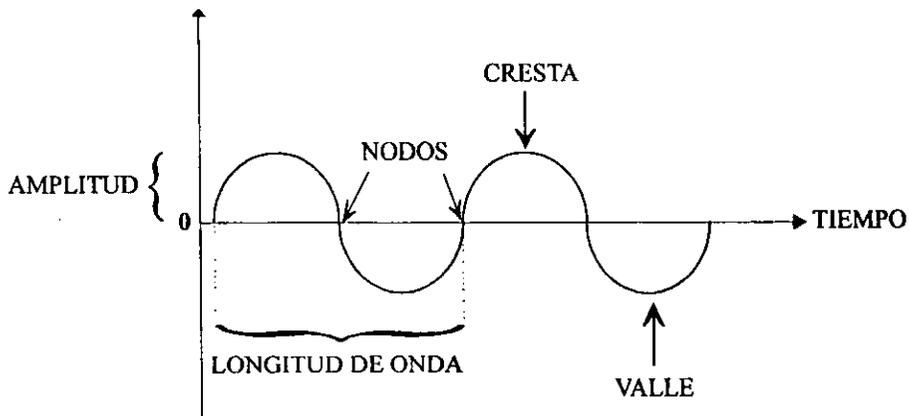


Fig. 3.1 Representación gráfica de una onda sinusoidal.

Es poco común estar relacionado con este tipo de conocimiento y en muchas ocasiones se confunden ondas de choque con las ondas ultrasónicas. Como fenómeno físico, cada una de ellas tiene sus propias características por lo que a continuación presentamos un cuadro comparativo con la finalidad de tener una idea clara de ellas y evitar confusiones posteriores<sup>27,47</sup>:

| CARACTERÍSTICAS                               | ONDAS DE CHOQUE  | ONDAS ULTRASÓNICAS <sup>1</sup>               |
|---|--|---|
| Cambios de presión                            | grandes  | pequeños                                      |
| Cambios de densidad                           | grandes  | pequeños                                      |
| Tipo de ondas                                 | Pico de presión único y muy grande con tiempo de ascenso sumamente corto y una relajación rápida         | Ondas sinusoidales con variaciones de presión |
| Espectro de frecuencia                        | Abarca desde frecuencias muy bajas hasta frecuencias muy altas; esto es, el espectro es sumamente amplio | Bien definido y uniforme                      |
| Transmisión a través de materiales biológicos | mayor  | menor   |

En las figuras 3.2 y 3.3 se muestran los perfiles de una onda ultrasónica y de una onda de choque.

Cuando la amplitud de una onda aumenta de forma considerable, por ejemplo, cuando se comprime súbitamente al medio de propagación, se crean regiones de muy alta y muy baja presión. En los puntos de presión alta la temperatura aumenta y como la velocidad de una onda depende de la temperatura, entonces en ese sitio la velocidad también aumenta. Sucede lo contrario en regiones de presión baja. Esto ocasiona que las crestas de la onda se propaguen a mayor velocidad que los valles y con ello la forma de la onda cambia al tipo de diente de sierra de forma tal, que la presión y temperatura varían rápidamente y podrían convertirse (si sea aumenta la amplitud de onda) en un frente de onda, como el de las OCD<sup>26,27</sup>.

<sup>1</sup> Ondas ultrasónicas del tipo usado para imagenología médica.

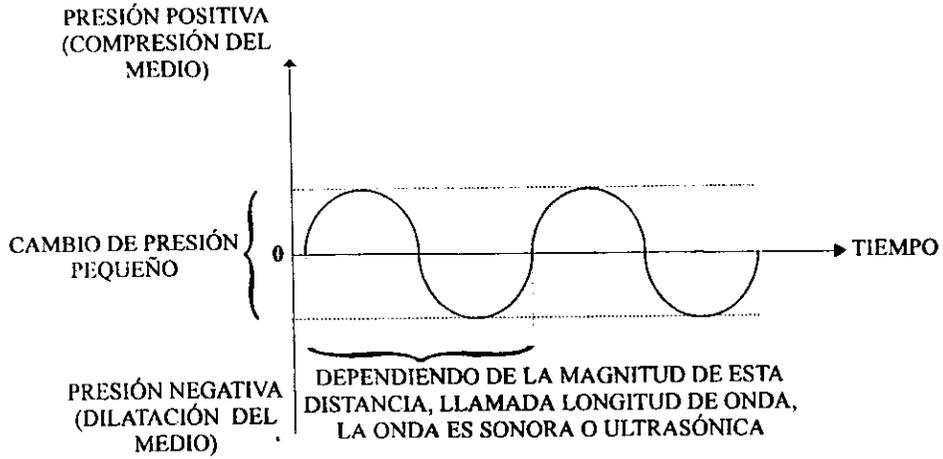


Fig. 3.2 Perfil de una onda sonora o ultrasónica.

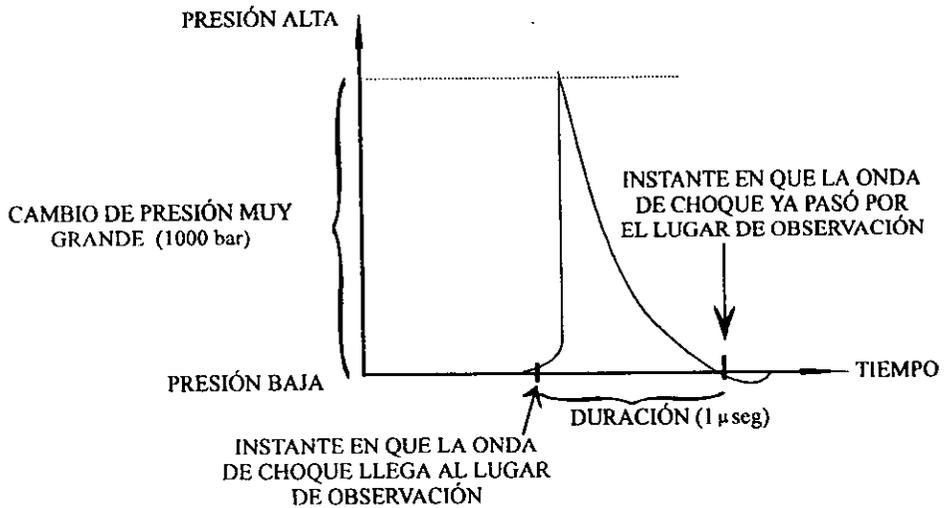


Fig. 3.3 Perfil de una onda de choque.

### 3.2 MÉTODOS DE GENERACIÓN

La onda de choque débil se genera por una discontinuidad de presión provocada por una compresión súbita del medio como en el caso de una explosión, en el cual la onda se difunde a través de éste produciendo daño en la mayoría de las ocasiones. Conforme hace su recorrido se convierte en una onda sonora de forma tal, que las personas que se encuentran alejadas de la explosión únicamente escuchan la detonación sin sufrir ningún daño<sup>27</sup>.

En el caso de la litotripsia extracorporal, el medio donde se genera la onda de choque débil es agua, y al aparato con que se producen se le llama litotriptor. Existen varias formas de generación: detonaciones de microexplosivos, concentración de la energía de un rayo láser en una región muy pequeña de agua, excitación de una serie de cristales piezoeléctricos, utilización de un electroimán y ruptura eléctrica entre dos electrodos<sup>27,28</sup>.

La generación de OCD por rompimiento eléctrico entre dos electrodos fué el primer método empleado en la litotripsia extracorporal, y debido a que se desarrolla dentro del agua, se le denomina electrohidráulico. Este método consiste en aplicar miles de volts a un par de terminales metálicas llamadas electrodos, separados por unos milímetros, creando un canal de vapor altamente ionizado, a presión y temperatura elevadas (miles de grados centígrados). Dentro de este canal de plasma se encuentran moléculas de agua, oxígeno, hidrógeno, ozono, átomos de oxígeno, hidrógeno y de los electrodos en todos sus estados de ionización y excitación, iones hidronio e hidroxilo<sup>23</sup>. Cuando la resistencia eléctrica entre los electrodos comienza a decrecer, fluye una corriente eléctrica muy grande a través del canal de plasma expandiéndolo a velocidades supersónicas (mayores a 1500 m/s en agua), instante en el cual hay una caída súbita del voltaje. Este rompimiento eléctrico ocurre en apenas unos cuantos microsegundos, no así la emisión luminosa que dura decenas de microsegundos. La energía que posee el plasma es casi totalmente cedida a la formación de la onda de choque, aunque también produce luz y calor. La onda generada, o más bien, el frente de onda, viaja después a una velocidad un poco mayor a la del sonido en agua mientras que la burbuja de plasma aún en expansión lo hace a una velocidad menor, colapsándose finalmente<sup>23</sup> (figura 3.4).

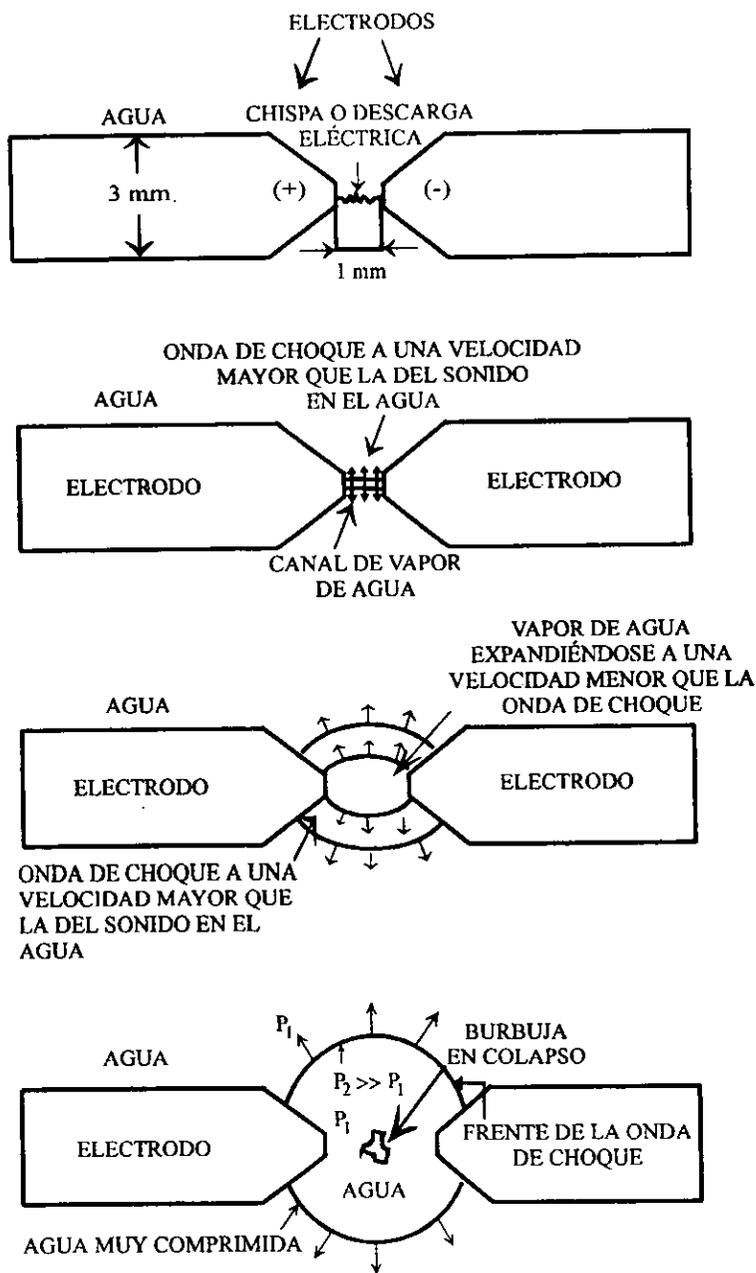


Fig. 3.4 La onda de choque es prácticamente esférica y se propaga por el agua mientras que la burbuja se colapsa.

La onda de choque generada, viaja a través del agua, cuyo frente es tan pequeño que puede considerársele como una discontinuidad de presión respecto a la de su entorno. La trayectoria que ahora sigue la onda de choque débil es dirigida hacia otra región mediante reflectores, de tipo parabólico o elíptico según sea el caso.

Los reflectores son sólidos de revolución truncados, hechos de acero inoxidable cuyas paredes internas tienen forma elíptica o parabólica que actúan como espejos reflejando la onda de choque. La generación de la onda para el reflector elíptico ocurre en lo que se considera el primer foco geométrico y es reflejada hacia el segundo, lugar donde se encuentra el objeto a tratar (figura 3.5).

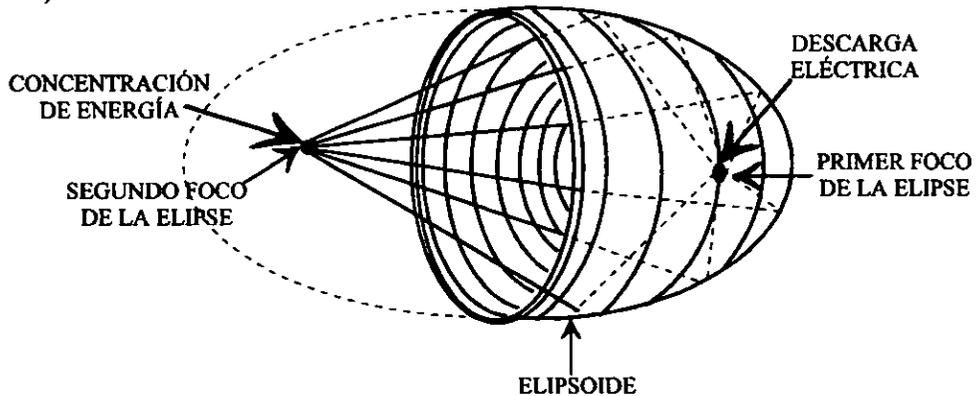


Fig. 3.5 Concentración de ondas de choque empleando un espejo elíptico.

Para el caso de la evaluación del efecto de las OCD sobre microorganismos, se empleó el reflector parabólico, que en lugar de concentrar la onda de choque en una región pequeña o foco, refleja la energía de manera que se produce un frente de onda plano (figura 3.6).

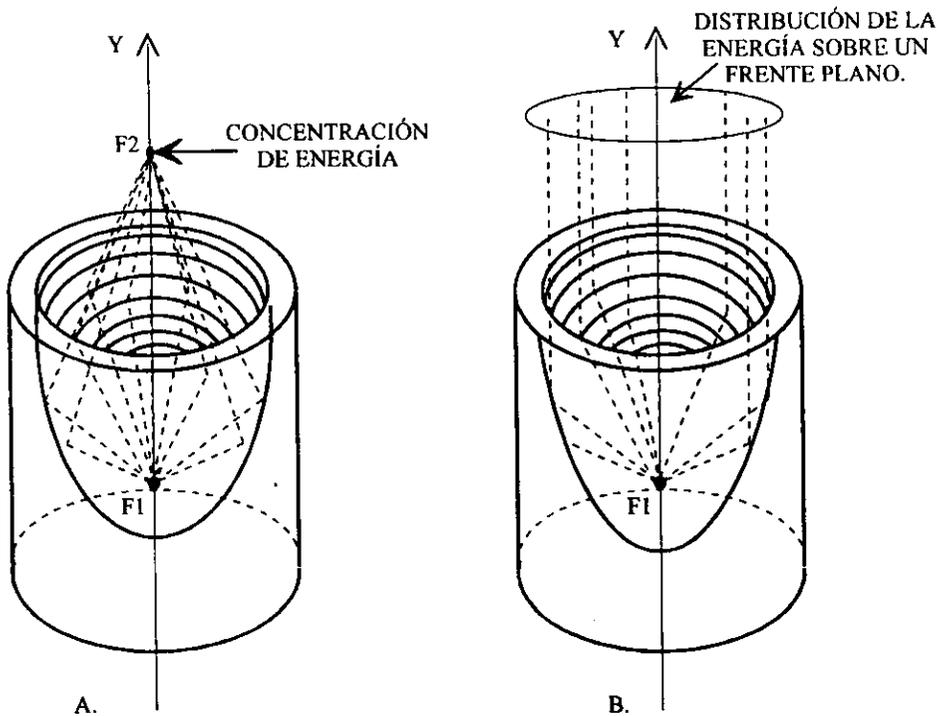


Fig. 3.6 A. Reflector elíptico, B. Reflector parabólico.

La generación de OCD utilizando microexplosivos tiene un principio similar al método electrohidráulico, en el que la microcarga al explotar, genera un plasma muy parecido al que se produce por la descarga eléctrica y la onda de choque tiene casi el mismo comportamiento, utilizando para concentrarla reflectores del tipo elíptico. Su principal desventaja es que hay que reemplazar al microexplosivo después de cada descarga para generar a la siguiente onda y, debido al número de descargas necesarias en un tratamiento, éste se prolongaría demasiado y sería difícil lograr la frecuencia de descargas que se requiere<sup>23,28</sup> (figura 3.7).

Los cristales piezoeléctricos, son cristales (generalmente de bario) que tienen la capacidad de aumentar o disminuir su tamaño rápidamente al aplicarles un alto voltaje. Al excitarlos con la corriente eléctrica aumentan su tamaño, comprimiendo el agua circundante y al regresar a su tamaño original,

dan origen al pulso de presión<sup>12</sup>. En su conjunto varios cientos de estos cristales son acomodados en la superficie de un disco, de manera tal que concentren las OCD en una región específica (figura 3.7).

El principio electromagnético consta de una bobina, en la que al circular la corriente eléctrica forma un campo magnético que tiene carga opuesta a una membrana de metal, de forma tal, que la repele y hace que comprima el medio, regresando a su posición original al interrumpir la corriente. Este cambio brusco genera una onda de choque plana, la cual es enfocada mediante lentes acústicos<sup>12</sup> (figura 3.7).

Un láser de cierta intensidad crea un canal de plasma cuando se concentra en una pequeña región de agua originando una onda de choque, la cual es dirigida con un reflector igual que en el método electrohidráulico.

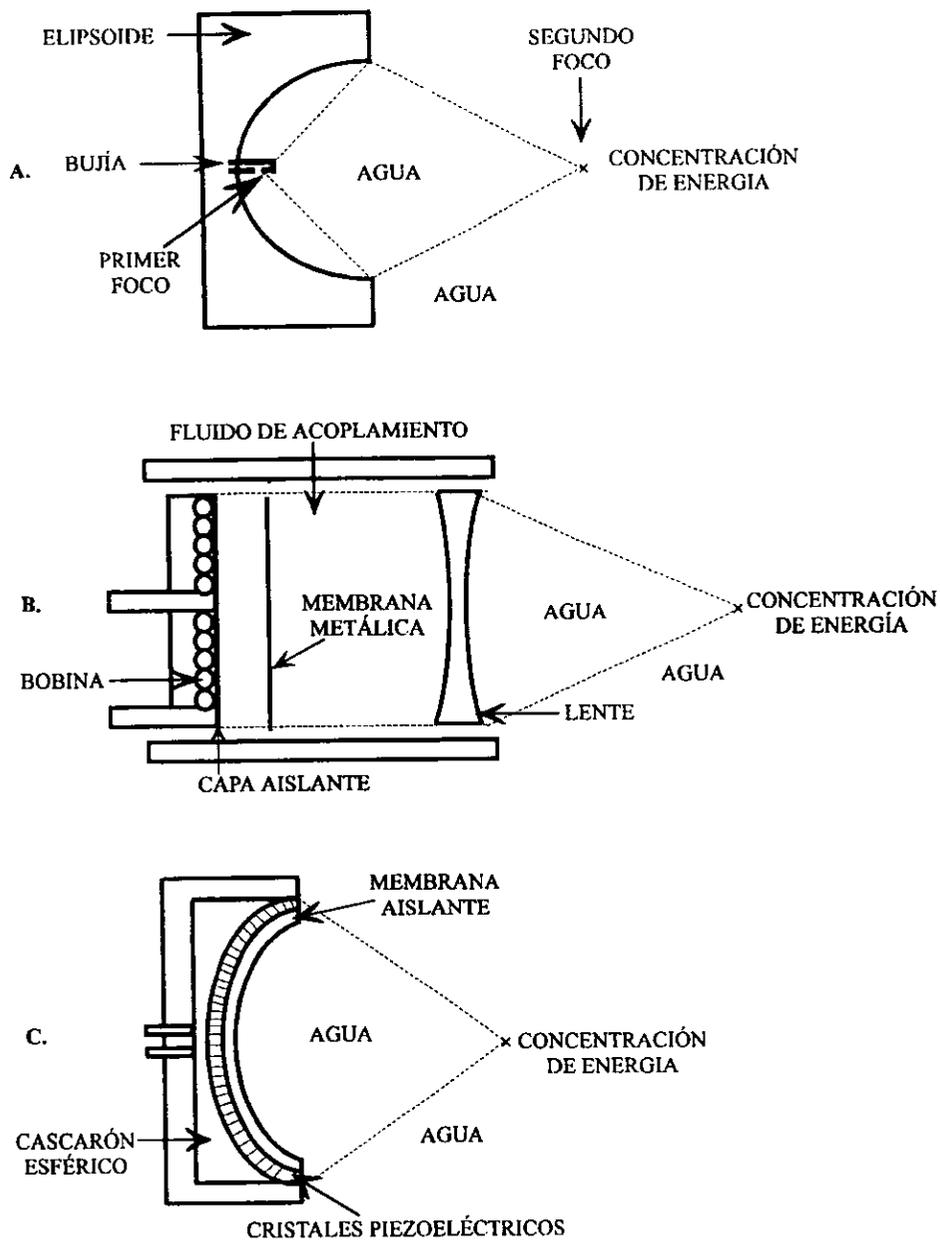


Fig. 3.7 A. Generador electrohidráulico de ondas de choque,  
 B. Generador piezoeléctrico de ondas de choque,  
 C. Generador electromagnético de ondas de choque.

A continuación se presenta una tabla mostrando las ventajas y desventajas de los diferentes métodos para su uso en litotripsia extracorporal<sup>23,28</sup>.

| MÉTODO DE GENERACIÓN | VENTAJAS  | DESVENTAJAS   |
|----------------------|---|---|
| Electrohidráulico    | Bajo costo.<br>Diseño sencillo.<br>Fácil manejo.<br>Más utilizado.  | Desgaste de electrodos.<br>Variaciones de presión entre una descarga y otra.<br>Posible interferencia con el ritmo cardiaco del paciente. |
| Microexplosivos      | Bajo costo de operación y construcción.   | Reemplazo de la carga explosiva.<br>Almacenamiento de explosivos.<br>Sistema lento.   |
| Electromagnético     | El perfil de presión es reproducible.   | Pulso de presión relativamente lento.<br>Desgaste de la membrana.   |
| Piezoeléctrico       | Bajo desgaste de sus componentes.<br>Alta frecuencia de disparo.<br>Bajo costo de operación.                        | Produce efectos de cavitación.<br>Región de máxima presión muy pequeña  |
| Láser                | No utiliza altos voltajes ni explosivos.<br>Mayor vida media del generador.<br>No produce campos electromagnéticos. | El umbral para generar el plasma se localiza fuera del punto focal.   |

### 3.3 APLICACIONES DE LAS ONDAS DE CHOQUE DÉBILES

El campo de aplicación de las ondas de choque débiles se ha extendido en su mayor parte a la medicina. Actualmente la litotripsia por medio de OCD es el método de elección para el tratamiento de más del 80% de cálculos renales y uretrales, se ha usado en millones de pacientes. Durante la sesión de tratamiento son aplicadas de 1000 a 4000 descargas. El número exacto depende entre otros factores del cálculo y del tipo de litotriptor. Los cálculos biliares también pueden ser sometidos a las OCD, sin embargo, esta terapia es menos usada debido a que aproximadamente un 80% de los casos permanecen de forma asintomática, por lo que son pocos los pacientes que requieren del tratamiento. En pacientes con trastornos pancreáticos crónicos también se ha probado este método y los resultados obtenidos lo proyectan como un método seguro y efectivo alternativo a la cirugía<sup>12</sup>.

Más allá de la fragmentación de cálculos, recientemente las ondas de choque están presentes en tratamientos ortopédicos. El trabajo en este campo se inició en 1986 con estudios experimentales de fracturas en conejos y perros<sup>16</sup>. El primer reporte acerca de tratamientos de pacientes con retraso en la unión o no unión de fracturas del que tenemos noticia apareció en 1991. Se requirió la aplicación de 1000 a 4000 ondas de choque para inducir la unión ósea en un 85%. A partir de entonces se han realizado otros estudios en los cuales se han obtenido resultados similares, además de investigar los efectos biológicos causados por este tratamiento<sup>13</sup>.

También en los 80's se realizaron investigaciones con la idea de emplear a las OCD en procesos oncológicos. Con los resultados obtenidos se demostró que la aplicación de OCD en células tumorales tiene un efecto citotóxico<sup>41</sup> y provocan destrucción celular por cavitación<sup>3</sup>. Se estableció la relación existente entre la dosis y el efecto y el posible mecanismo de daño. La razón por la cual se abandonaron las investigaciones en este campo, fué la reaparición de células malignas después del tratamiento<sup>8,46</sup>.

Actualmente en gran parte del mundo se realizan investigaciones para la búsqueda de aplicaciones novedosas en el campo químico, médico, físico y

biológico<sup>29</sup>. Nuestra propuesta está encaminada a presentar a las ondas de choque como un método alternativo para la esterilización.

---

---

## 4. APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES EN MICROBIOLOGÍA

---

Las técnicas actuales de esterilización son el resultado de la búsqueda de mejoría continua, lo cual las hace más efectivas, incrementando en ocasiones su campo de aplicación. Sin embargo, algunas industrias tienen necesidades que superan los avances alcanzados, dando lugar al desarrollo de investigaciones que resuelvan esta problemática.

La industria alimentaria es un claro ejemplo que envuelve procesos que han permanecido sin avance casi desde que se instauraron. La conservación de los alimentos se ha convertido en punto focal para dirigir la investigación de técnicas alternativas que de preferencia esterilicen los alimentos y no alteren sus características nutritivas y organolépticas. En respuesta a este creciente interés, al inicio de la década pasada conceptos físicos antes no relacionados o poco estudiados con este fin, son aplicados para inactivar poblaciones microbianas. Principios como pulsos eléctricos de alto voltaje, oscilaciones magnéticas, radiaciones ionizantes, pulsos de luz intensa y tratamientos de alta presión se encaminan como el fundamento de técnicas novedosas llamadas "pasteurización en frío"<sup>34,36</sup>.

Las ondas de choque débiles dentro de sus nuevas aplicaciones pueden contemplarse como una valiosa alternativa para esterilizar materiales de consistencia líquida que son afectados en sus propiedades fisicoquímicas con los métodos convencionales, no contemplando sólo a los alimentos (jugos, leche, néctares y extractos), sino también a preparados farmacéuticos (soluciones y suspensiones), compuestos de origen biosintético y aguas residuales con alto contenido microbiano.

## 4.1 GENERALIDADES

Como mencionamos anteriormente existen técnicas prometedoras en el área del control de los microorganismos que en algunos casos ya se implementaron en varios países y otras que aún permanecen en fase de experimentación. Algunos resultados o avances de estos estudios tienden únicamente a conservar los alimentos sin llegar a la esterilización; sin embargo, hay un estrecho vínculo en el campo de aplicación, por lo cual presentarlos puede ser de gran ayuda para comprender mejor este estudio. Dentro de ellos destacan los siguientes:

- La aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje a suspensiones celulares, empleando un electrodo hueco variando la intensidad y el tiempo de exposición, crea una diferencia de potencial, misma que afecta la permeabilidad de la célula microbiana originando su muerte. La inactivación resultante que se observa es del orden del 90% en la suspensión empleada<sup>34,45</sup>.

- La energía ionizante puede esterilizar materiales relacionados con la industria alimentaria. Actualmente se ha utilizado para eliminar a los microorganismos de la superficie de carne fresca en refrigeración, aumentando así el tiempo que ésta puede permanecer almacenada sin ser descompuesta<sup>38</sup>. Dada la naturaleza de las fuentes de energía ionizante empleadas, su utilización en alimentos, no sólo para productos cárnicos, está sujeta a regulaciones que establecen los parámetros y límites de sus usos<sup>5, 22, 50</sup>.

- La mayoría de las aplicaciones que tienen las ondas de ultrasonido en los alimentos, son para desgasificar líquidos y facilitar el paso a través de membranas y biomateriales<sup>14</sup>. Aunque se han hecho estudios con microorganismos presentes en alimentos<sup>15</sup>, aún no se ha observado un efecto claro; sin embargo, hay reportes que muestran resultados consistentes respecto a la disminución de bacterias en carne, luego de recibir un tratamiento con ultrasonido<sup>21</sup>.

## 4.2 APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES A MICROORGANISMOS

La aplicación de altas presiones es una de las últimas metodologías desarrolladas para controlar a los microorganismos y actualmente se practica en países como Japón<sup>35,36</sup>. Sin embargo, pese a que se aplicaron en alimentos como jugos y bebidas alcohólicas desde finales del siglo pasado, los avances tecnológicos de ese tiempo no permitieron su implementación, salvo en casos aislados<sup>17</sup>. Mientras que la práctica en el campo industrial se dejó en el abandono, no ocurrió así con las investigaciones del efecto de la presión sobre microorganismos, principalmente en aquéllos que viven sometidos a una alta presión como parte de su hábitat, por ejemplo los que se encuentran a cierta profundidad en el mar y que por lo tanto, son contaminantes en alimentos que provienen de la misma entidad o a microorganismos empleados en la industria como las levaduras que se encuentran en los enormes tanques donde se produce la cerveza. Es importante resaltar que en ambas situaciones las presiones jamás superan mil atmósferas y la exposición a una presión mayor quizá tendría un efecto distinto.

La investigación en este campo se ha realizado con presiones constantes ejercidas por agua, por lo que se llaman presiones hidrostáticas, es decir, sin cambios en la magnitud de la fuerza aplicada, o bien, presiones estáticas. Las presiones dinámicas, son aquellas que cambian su valor continuamente y de forma repetida, como si estuvieran en movimiento. La diferencia con las primeras, es que hasta ahora prácticamente no se tiene nada documentado porque nunca se había experimentado con ello, hasta que surgió la idea de aplicar una presión dinámica empleando a las ondas de choque.

### 4.2.1 Presiones Estáticas

El efecto de altas presiones en alimentos y microorganismos se conoce desde el inicio del siglo XX. En 1903 Chlopin y Tamman observaron efectos inhibitorios de la presión en bacterias, por ejemplo, disminución de la movilidad, decremento en la capacidad de multiplicarse, disminución de su virulencia y en general cambios en su metabolismo<sup>51</sup>.

La reducción de la contaminación microbiana en productos farmacéuticos, alimenticios y biotecnológicos, entre otros, es necesaria para su producción diaria. La inactivación por radiación, gases químicos o tratamientos térmicos pueden ocasionar detrimento en sus características o se encuentran restringidas por las leyes<sup>9</sup>.

Las investigaciones recientes de tratamientos con presiones, han mostrado que pueden ser una mejor opción, debido a que los productos conservan sus características esenciales, como las propiedades organolépticas y nutritivas<sup>56</sup> de los alimentos. Los efectos de altas presiones incluyen la inactivación de microorganismos, la modificación de biopolímeros; tal como la desnaturalización de proteínas, la activación o desactivación de enzimas, la formación de geles, influencia en la degradación, la conservación de la calidad de sabor y color (debido a que únicamente los enlaces no covalentes son afectados por las presiones) y, cambios en la reología de los productos por ejemplo: modificaciones en la densidad, temperaturas de fusión y de ebullición, así como cualidades en su textura<sup>19</sup>.

Recientemente se propuso el uso de altas presiones para esterilizar y mejorar el procesamiento de alimentos. Grupos de investigadores han reportado algunas otras aplicaciones<sup>40</sup>. Se han realizado diversos estudios encaminados hacia la esterilización, en los cuales se reporta la inactivación de microorganismos como efecto de la presión con resultados alentadores<sup>6,10,33</sup>. También se han propuesto posibles mecanismos de daño empleando presiones elevadas<sup>48</sup>. Es importante señalar que estos estudios se han llevado a cabo con el manejo de presiones estáticas y que aunque los resultados de las investigaciones lo demuestren como un método alternativo de control de microorganismos, también existen inconvenientes como la resistencia de algunos de ellos a presiones elevadas<sup>20</sup>.

### **2.3.2 Presiones Dinámicas**

Hemos mencionado el efecto de altas presiones estáticas sobre microorganismos y la necesidad de crear métodos que puedan cubrir los requerimientos de varias industrias (alimentaria, farmacéutica y biotecnológica, entre otras), es por eso que surgió la idea de proponer a las ondas de choque como método alterno de esterilización. Se ha documentado ampliamente el daño que sufren los microorganismos al ser sometidos a presiones estáticas

elevadas, a diferencia de lo investigado al aplicar una presión más alta y durante un lapso muy corto de tiempo, por repetidas ocasiones, como sucede al aplicar las ondas de choque, de forma tal, que si imaginamos este hecho, nuestra idea sea quizá la de simular un golpeteo constante ya que la onda de choque aumenta y disminuye súbitamente la presión. De esta manera se planteó la posibilidad de la inactivación de microorganismos con un método de esterilización aplicable a toda industria en la que se manejen líquidos y que por la estructura de ésta o del producto no es posible someterlos a los procedimientos tradicionales de esterilización. Un ejemplo claro es la industria alimentaria en diversos rubros como lo es la leche, los jugos, las bebidas alcohólicas y otros alimentos, en los que únicamente se logra controlar, bajo ciertas condiciones, la contaminación microbiana existente, pero que de ninguna manera se puede hablar de inactivación total.

En este campo únicamente tenemos noticia de estudios realizados por un grupo de investigadores que trabaja en la aplicación de ondas de choque sobre microorganismos<sup>39,49</sup>. El equipo empleado en dichos estudios es diferente al que utilizamos en el presente trabajo. Nuestro equipo alcanza presiones más elevadas y es más versátil, por lo que se pueden variar parámetros inherentes a su diseño, por ejemplo: voltaje, frecuencia de generación de las OCD, tipo de reflector, posición de la muestra y reordenamiento de la misma, entre otras.

La idea de emplear OCD como método de esterilización surge del conocimiento que se tiene del daño celular observado como efecto colateral de los tratamientos de litotripsia extracorporeal y después de la aplicación directa sobre cultivos celulares<sup>8,12</sup>. Para evaluar esta posibilidad fue necesario utilizar microorganismos con características conocidas en un medio que permitiera la observación del efecto de las OCD sin interferencias, partiendo de una población conocida y con ello establecer una cinética de muerte para demostrar en términos de probabilidad de supervivencia luego del tratamiento, si este método tiene los atributos para considerarlo a futuro como una alternativa en el campo de la esterilización.

El proyecto consta de varias etapas, que se muestran de forma esquemática a continuación:



fundó en 1987 el Laboratorio de Choques Débiles del Instituto de Física de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con el objetivo de realizar investigaciones sobre la desintegración de cálculos, mejorar la tecnología de los equipos utilizados comercialmente y buscar nuevas aplicaciones a las ondas de choque en áreas como la química, medicina y biología. Para ello, se construyó el generador experimental denominado Mexilit I, al cual se le hicieron modificaciones novedosas para convertirse en el Mexilit II. La diferencia de este tipo de generadores con los ya existentes en el mercado, es su gran versatilidad de uso, el costo que es considerablemente inferior y el propósito con el que fueron construidos, existiendo sólo uno o dos generadores similares a este en el mundo.

El Mexilit II consiste básicamente en una tina de pruebas, montada sobre una base de acero, con dos grúas móviles de precisión sobre ella, un circuito eléctrico, bujías, reflectores y un sistema de control (figura 4.1).

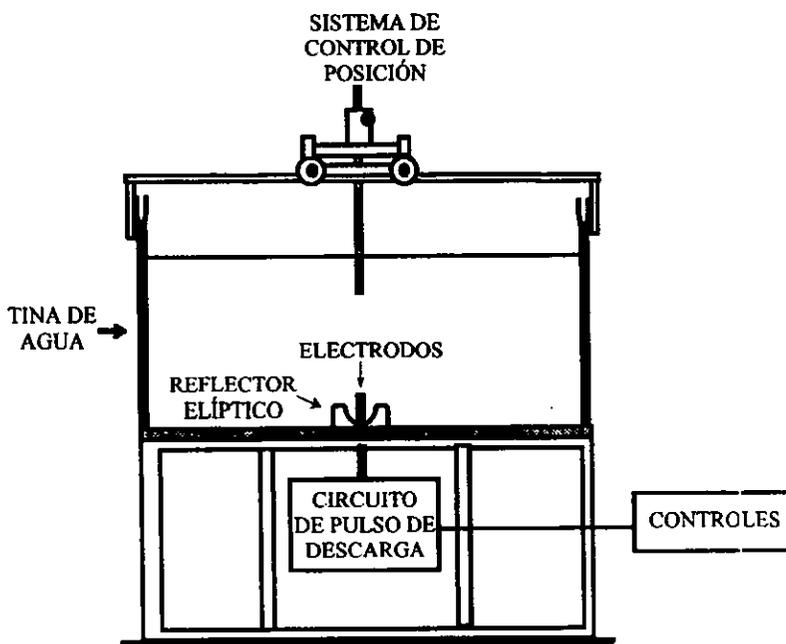


Fig. 4.1 Diagrama simplificado del generador electrohidráulico de ondas de choque Mexilit II.

La tina de pruebas es un tanque de fibra de vidrio de 120 cm de largo por 80 cm de ancho y 60 cm de alto, montada sobre una estructura de acero. Tiene tres entradas y dos salidas de agua proveniente de un sistema de desaeración ubicadas de manera opuesta cerca de la base de la tina, además de cuatro ventanas, una a cada lado, para facilitar la visibilidad. Sobre la tina se encuentra un sistema de precisión de dos grúas que se desplazan longitudinal y transversalmente sobre rieles redondos de acero inoxidable. Los movimientos dentro de la tina, se obtienen girando un dispositivo que activa una barra metálica en cuyo extremo se sujeta el objeto de estudio. Cada grúa posee un motor independiente por cada grado de libertad, de modo que todos los movimientos del sistema pueden controlarse de forma manual o mediante una computadora (figura 4.2).

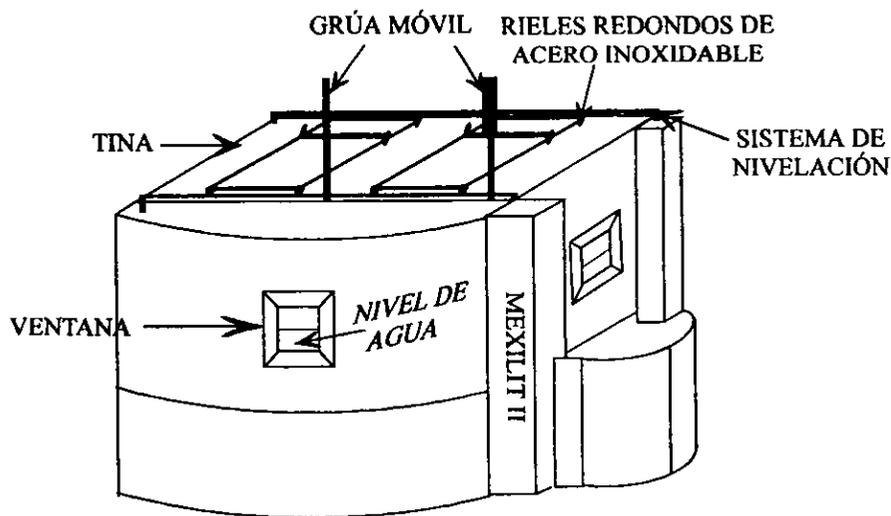


Fig. 4.2 Esquema simplificado del generador de ondas de choque experimental MEXILIT II.

El circuito eléctrico es el componente principal de un generador de ondas de choque. Está formado por dos sistemas; el de carga de energía eléctrica y el que controla la frecuencia de la descarga. El diseño de todo el circuito debe mantener la menor inductancia posible con el fin de tener un mayor control del

instante de la descarga, el cual puede hacerse una sola vez o con una frecuencia determinada. Los principales constituyentes del circuito son una fuente de alto voltaje, un oscilador, un transmisor óptico, un convertidor optoelectrónico con fuente de alto voltaje, un disparador, uno o varios condensadores y las resistencias<sup>23,26,28,42</sup>. La fuente de alto voltaje carga los condensadores a través de una serie de resistencias de alto voltaje. Uno de los polos del condensador se conecta a tierra y a uno de los electrodos de la bujía dentro de la tina, y el otro al disparador. Una vez que los condensadores se han cargado con el voltaje deseado, el oscilador envía una señal óptica transmitida a través de una fibra óptica hasta el convertidor optoelectrónico, donde la transforma en un impulso de alto voltaje que llega al interruptor de chispa y lo acciona, provocando que los condensadores se descarguen a través de los electrodos de la bujía dentro de la tina. Una vez descargados los condensadores, la fuente de alto voltaje los carga nuevamente, el oscilador envía otra señal óptica para repetir el proceso<sup>23,26,28,42</sup> (figura 4.3).

Cada vez que se realiza el proceso anterior, se genera una onda de choque dentro de la tina, mediante el rompimiento eléctrico entre los electrodos. La onda de choque, es reflejada por un reflector, elíptico, si se desea concentrar la onda de choque en una región específica llamada segundo foco y, parabólico, si la onda de choque requerida es plana.

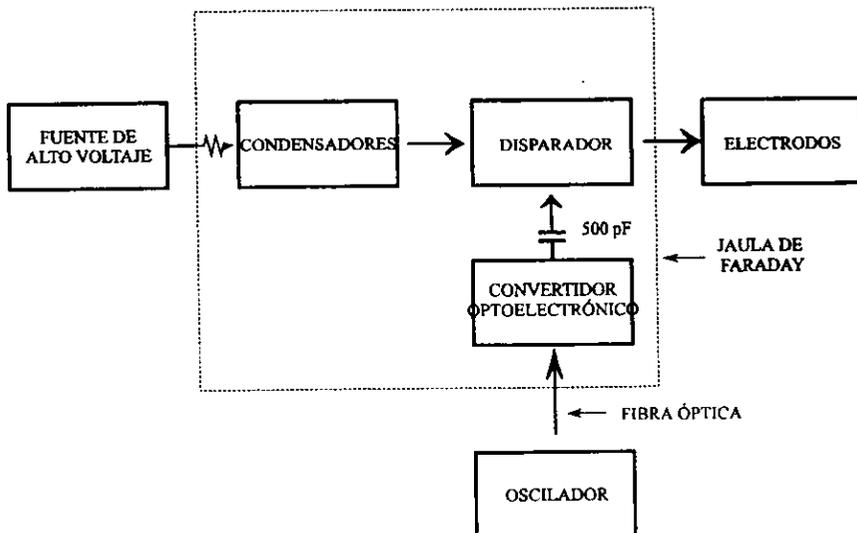


Fig. 4.3 Diagrama de flujo del circuito eléctrico del Mexilit II.

---

---

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

---

El desarrollo del presente estudio consistió de varias etapas previas al establecimiento del protocolo principal. Entre ellas se contempla la elección del microorganismo, la etapa óptima de crecimiento, la concentración inicial del inóculo y el establecimiento del número de ondas de choque.

Se eligió *Escherichia coli* ATCC 10536 como el primer microorganismo en el cual se observaría el efecto de las ondas de choque débiles, empleando un generador electrohidráulico, por ser una bacteria de la cual se posee un conocimiento extenso, además de ser fácil de manejar y no patógena. El siguiente paso fue la elección de la etapa de crecimiento en la que sería sometida a la acción de las OCD. Para ello se realizó la curva de crecimiento característica a fin de documentar el estado fisiológico del microorganismo. El establecimiento de la concentración inicial se basó en datos bibliográficos de cuentas de microorganismos que se emplearon con propósitos similares y de cantidades reportadas como contaminantes en algunos productos alimenticios. La carga del inóculo se sometió en los primeros ensayos a un número de ondas de choque variable para saber en qué grado se observaba un efecto y de esta forma planear la duración del experimento. Aunque el objetivo de este estudio no es el conocer o plantear el mecanismo de acción de las OCD, se decidió tratar de dilucidar si el efecto obtenido era realmente por ellas o por factores inherentes al equipo, para lo cual se planteó una estrategia a seguir que consistió en realizar dos tipos de ensayos, uno en el que se protegía de la luz generada por la descarga eléctrica y otro que no tenía protección alguna. Además se realizaron mediciones de presión empleando un transductor con la finalidad de conocer si existía alguna diferencia entre ambos ensayos por efecto del dispositivo empleado.

### Material:

Las especificaciones del material, reactivos y equipo se encontrarán en un apartado del apéndice.

Algodón.

Asas microbiológicas.

Bolsas de plástico del tipo protector para papel fotográfico.

Cajas de petri estériles desechables.

Cinta indicadora para autoclave.

Cronómetro.

Espátula.

Gasas.

Gradillas.

Matraces erlenmeyer estériles de 125, 250, 500 y 1000 mL.

Mecheros tipo bunsen y fisher.

Pipetas estériles de 1, 4 y 10 mL.

Pipetas de 4 mL estériles desechables.

Pipeteros.

Raqueta de acrílico con perforaciones.

Termómetros.

Transductor.

Tubos de 16 × 150 con rosca y tapón estériles.

Tubos de centrifuga estériles.

Vasos de precipitado de 500 y 1000 mL.

Vidrios de reloj.

### Soluciones y medios de cultivo:

Agar nutritivo estéril.

Agar para cuenta en placa estéril.

Caldo nutritivo estéril.

Solución de cloruro de sodio al 20%

Solución salina isotónica estéril (SSI).

### Material biológico:

Cepa de *Escherichia coli* ATCC 10536 (*E.coli* ATCC 10536).

Cultivo de *E.coli* ATCC 10536 de 24 hr. en caldo nutritivo.

### Equipo:

Agitador de tubos tipo vortex.  
Agitador y barra magnéticos.  
Autoclave.  
Balanza analítica.  
Baño de agua de temperatura controlada.  
Centrífuga.  
Fotómetro.  
Generador de ondas de choque Mexilit II.  
Horno.  
Incubadora con control térmico.  
Microscopio óptico.  
Osciloscopio.  
Refrigerador.

### Curva de Crecimiento:

Se inocularon por asada dos matraces erlenmeyer con 50 mL de caldo nutritivo y se incubaron a una temperatura de 37°C. Durante ocho horas se tomaron muestras a intervalos de 30 minutos para determinar la absorbancia del cultivo a una longitud de onda de 623 nm. Las lecturas siguientes se registraron cada hora hasta completar 12 horas y finalmente tomamos una lectura a las 24 horas de incubación.

### Preparación de la muestra:

Se inocularon por asada dos matraces erlenmeyer con 50 mL de caldo nutritivo y se incubaron a 37°C durante 24 horas. También se incubó un tercer matraz con la misma cantidad de medio sin inocular para emplearlo como blanco.

Al término del período de incubación, registramos la absorbancia a una longitud de onda de 623 nm en un fotómetro acoplado al baño de agua ajustado previamente a 27°C, utilizando el medio sin inocular como blanco.

Distribuimos el cultivo del matraz cuya absorbancia fue más cercana a 0.400 en los tubos de centrífuga para lavar tres veces las células con solución

salina isotónica (SSI), luego de centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos cada vez.

Resuspendimos las células lavadas con 5 ml de SSI en cada tubo, juntando las suspensiones en un matraz erlenmeyer de 250 mL y ajustamos la absorbancia a 623 nm a 27°C, diluyendo con pequeñas cantidades de SSI hasta obtener un valor entre 0.245 y 0.250, utilizando SSI como blanco.

Transferimos 10 mL de la suspensión recién ajustada a un matraz erlenmeyer que contiene 290 mL de SSI (dilución 1 en 30).

### Parte experimental:

Llenamos 56 pipetas desechables sellándolas con flama de un mechero. Colocamos 28 de ellas en una raqueta de acrílico debidamente dispuestas para someterlas a la acción de las ondas de choque débiles dentro del Mexilit II (Figura 5.1), y el resto las acomodamos en el baño de agua con temperatura controlada lejos de la interacción con las ondas de choque.

La sesión experimental se realizó de dos maneras; una sin protección a la luz emitida por la descarga eléctrica y la segunda, en la que cada pipeta desechable (también llamada vial) se colocó dentro de una bolsa de plástico especial que la aísla de la luz generada (figura 5.2).

Después de llenar los 56 viales y antes de iniciar la aplicación de las ondas de choque, realizamos diluciones seriadas (1:10) de la suspensión y cuantificamos mediante la técnica de Cuenta en Placa (ver apéndice). Realizamos tanto las diluciones como la cuantificación por duplicado, partiendo directamente de la suspensión. El número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) resultante de este punto, se tomó como muestra control para cero ondas de choque.

Al término de cada serie de 500 ondas de choque tomamos de forma aleatoria cuatro viales sometidos a las ondas de choque débiles, los cuales denominamos "muestras tratadas" y también su equivalente en los viales ubicados dentro del baño de agua con temperatura controlada, a los que denominamos "muestras control". Mezclamos el contenido de cada muestra en tubos debidamente identificados y que correspondían tanto a las muestras

tratadas como a las muestras control. Realizamos las diluciones y cuantificamos de igual forma que a las muestras control para cero ondas de choque.

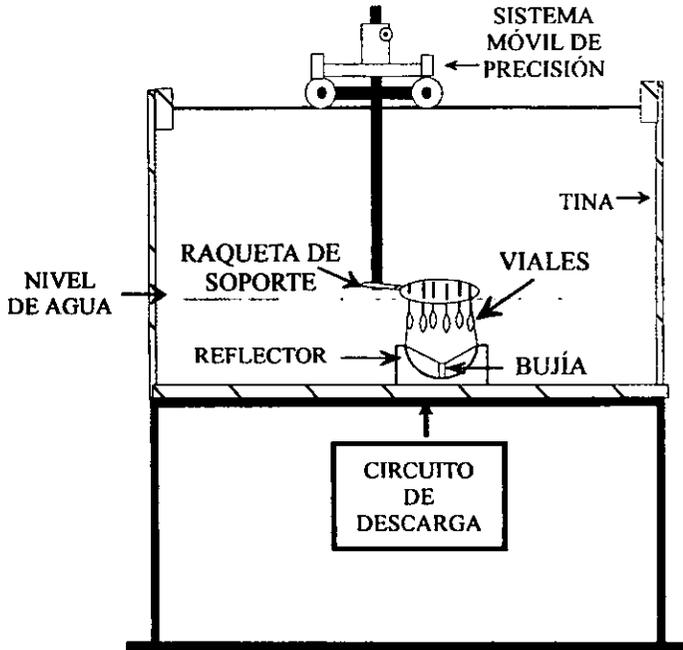


Figura 5.1 Disposición de muestras a tratar en el MEXILIT II

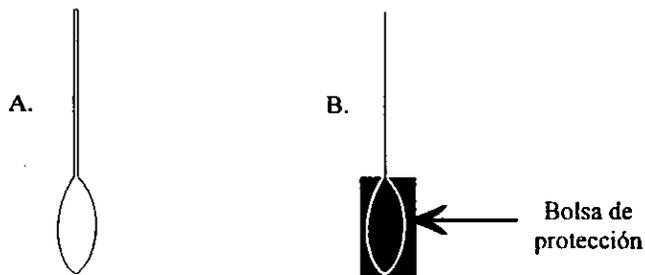


Fig. 5.2 Pipetas empleadas en el estudio :  
 A. Estudios sin protección de la radiación  
 B. Estudios con protección de la radiación

## Medición del campo de presión<sup>2</sup>

Se colocó un transductor de presión de fluoruro de polivideno, marca Imotec (Imotec GmbH, Würselen, Alemania), a 10 cm del eje de simetría de una bujía dentro del Mexilit II. En este caso no se usó reflector, de manera que únicamente se registró la presión de la onda de choque que viajó directamente desde los electrodos hasta el transductor, situado a 14.5 cm del fondo de la tina. El transductor se conectó directamente a un osciloscopio Tektronix 2430A, ajustado con una ganancia de 2 mV/div y una base de tiempo de 50  $\mu$ seg/div. Antes de comenzar con las mediciones de presión, se calentó la bujía con 200 OCD a 18 kV.

El experimento se dividió en dos partes: en la primera parte, se registraron 50 mediciones de presión con el transductor descubierto, posteriormente 50 mediciones con el transductor dentro de un vial, igual a los utilizados con la suspensión de *E. coli* ATCC 10536, lleno con solución salina isotónica y finalmente 50 mediciones cubriendo el vial con una bolsa como las utilizadas para bloquear la luz ultravioleta, manteniendo el transductor dentro del vial y de la solución empleada.

En la segunda parte del experimento se registraron 50 mediciones de presión con el transductor descubierto y posteriormente 50 mediciones con el transductor cubierto con la bolsa de plástico. En todos los casos, se descartaron los 5 valores más grandes y los 5 valores más pequeños y los resultados se sometieron a un análisis estadístico desarrollado en el Laboratorio de Choques Débiles para evaluar resultados de este tipo. En todos los casos únicamente se midió la altura del pico principal con los cursores del osciloscopio.

## Medición del paso de luz a través de las bolsas<sup>3</sup>

Se realizaron espectros de absorción de las bolsas realizando barridos de 200 a 900 nm en el aparato Milton Roy 3000 Array-uv vis registrando las lecturas en % transmitancia.

---

<sup>2</sup> Mediciones realizadas por Achim Loske y Arturo Méndez en el Laboratorio de Choque Débiles del IFUNAM.

<sup>3</sup> Mediciones realizadas por el Dr. Jorge García.

---

---

## 6. RESULTADOS

---

El proyecto fue desarrollado en varias etapas: la primera consistió en la preparación de la muestra, tomando en cuenta sus características de crecimiento, se emplearon cultivos de 24 horas de *E.coli* ATCC 10536 en caldo nutritivo incubados a 37°C para ajustar el inóculo a utilizar en cada ensayo. A partir de estos resultados se diseñó la metodología descrita en el capítulo anterior. Bajo las condiciones establecidas, la población bacteriana del inóculo se encontraba entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL, intervalo que aceptamos, ya que al someterlas a las OCD, el efecto se observaría igual en una u otra población siempre que se conociera el número inicial.

Una vez ajustada la población inicial se diseñó el mecanismo bajo el cual se sometió el inóculo al tratamiento. Primero se consideró suministrar 2000 ondas de choque con una frecuencia de 1 onda de choque cada 2.5 segundos. Con la experiencia de los primeros ensayos decidimos aumentar el número de ondas de choque a 2500, para observar un efecto mayor. También, aunque no fue el propósito de este estudio, intentamos dilucidar el posible mecanismo de inactivación de los microorganismos, mismo que puede deberse a efectos de cavitación, a efectos mecánicos por altas presiones, a la generación de radicales libres y a la luz emitida por la descarga eléctrica. Esta última despertó mayor interés por lo que realizamos ensayos en los cuales utilizamos un dispositivo que impide el paso de luz de manera tal, que la única modificación fué colocar a cada vial una bolsa de protección del material con el que se cubre el papel fotográfico no expuesto. De esta forma se impide el paso de la radiación. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado con muestras sometidas a las ondas de choque (tratadas) y muestras en paralelo, las cuales se mantuvieron en condiciones prácticas semejantes a las muestras tratadas fuera del alcance de las OCD (controles).

A continuación presentamos los resultados obtenidos. En la primera parte señalamos los parámetros en que operó el MEXILIT II, seguido de las

tablas y gráficas para cada ensayo, comparando la población microbiana sobreviviente de las muestras tratadas y las controles. Los primeros cinco ensayos corresponden al tratamiento de viales sin protección y los últimos cinco, a muestras con protección. Al finalizar cada serie presentamos un cálculo estadístico para determinar si existe una diferencia significativa antes del tratamiento y después de éste, para cada serie (ensayos con protección y sin ella).

## MEXILIT II.

Reflector : Parabólico (P1)

Voltaje :  $(20 \pm 0.1)$  kV.

Frecuencia : 1 onda de choque cada  $(2.5 \pm 0.1)$  seg.

Capacitancia : 80 nF.

Conductividad de agua :  $(960 \pm 2)$   $\mu$ S/cm.

Temperatura :  $(27 \pm 0.1)$  °C.

Calentamiento de electrodos : 400 ondas de choque a  $(18 \pm 0.1)$  kV.

### Baño de agua

Temperatura :  $(27 \pm 0.1)$  °C.

Las pruebas bioquímicas realizadas antes y después del tratamiento no reflejaron cambio alguno en el metabolismo de *E.coli* ATCC 10536.

| Prueba bioquímica | Antes del tratamiento | Después del tratamiento |
|-------------------|-----------------------|-------------------------|
| Kliger            | A/A                   | A/A                     |
| H <sub>2</sub> S  | Negativo              | Negativo                |
| Citrato           | Negativo              | Negativo                |
| Movilidad         | Positivo              | Positivo                |
| Indol             | Positivo              | Positivo                |
| Urea              | Negativo              | Negativo                |

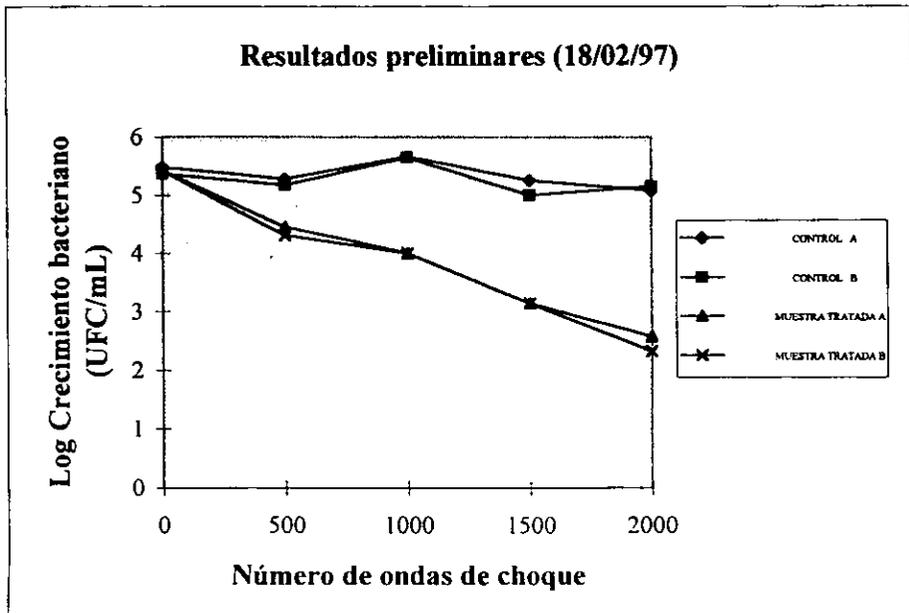
EXP.# 1

FECHA

18/02/97

| NÚMERO DE<br>OCD | CONTROL |        | MUESTRA TRATADA |        |
|------------------|---------|--------|-----------------|--------|
|                  | A       | B      | A               | B      |
| 0                | 300000  | 230000 | 265000          | 265000 |
| 500              | 190000  | 150000 | 28000           | 20000  |
| 1000             | 460000  | 440000 | 10000           | 10000  |
| 1500             | 180000  | 100000 | 1400            | 1400   |
| 2000             | 120000  | 140000 | 380             | 210    |

| NÚMERO DE<br>ONDAS DE<br>CHOQUE | LOG <sub>10</sub> |            |                 |            |
|---------------------------------|-------------------|------------|-----------------|------------|
|                                 | CONTROL           |            | MUESTRA TRATADA |            |
|                                 | A                 | B          | A               | B          |
| 0                               | 5.47712125        | 5.36172784 | 5.42324587      | 5.42324587 |
| 500                             | 5.2787536         | 5.17609126 | 4.44715803      | 4.30103    |
| 1000                            | 5.66275783        | 5.64345268 | 4               | 4          |
| 1500                            | 5.25527251        | 5          | 3.14612804      | 3.14612804 |
| 2000                            | 5.07918125        | 5.14612804 | 2.5797836       | 2.32221929 |



Reporte en UFC/mL

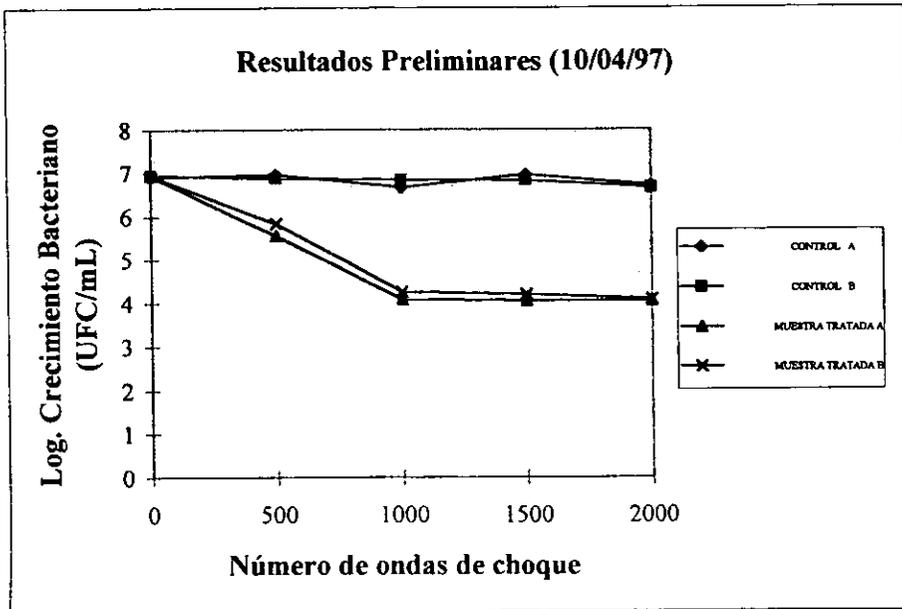
EXP.# 2

FECHA

10/04/97

| NÚMERO DE<br>OCD | CONTROL |         | MUESTRA TRATADA |         |
|------------------|---------|---------|-----------------|---------|
|                  | A       | B       | A               | B       |
| 0                | 7800000 | 8800000 | 8300000         | 8300000 |
| 500              | 9100000 | 7200000 | 350000          | 670000  |
| 1000             | 4300000 | 6700000 | 12000           | 18000   |
| 1500             | 8700000 | 6400000 | 11000           | 16000   |
| 2000             | 4800000 | 4400000 | 11000           | 12000   |

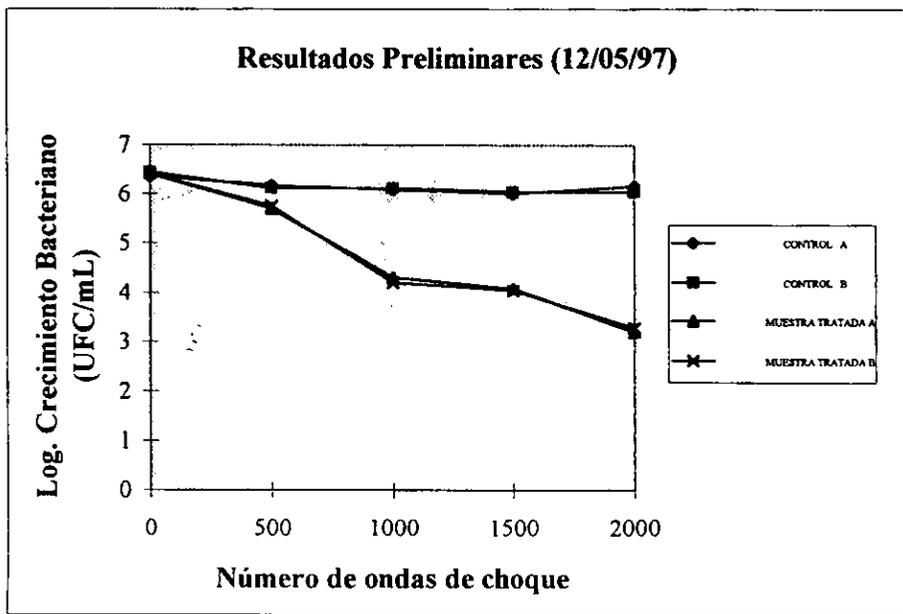
| NÚMERO DE<br>ONDAS DE<br>CHOQUE | LOG <sub>10</sub> |            |                 |            |
|---------------------------------|-------------------|------------|-----------------|------------|
|                                 | CONTROL           |            | MUESTRA TRATADA |            |
|                                 | A                 | B          | A               | B          |
| 0                               | 6.8920946         | 6.94448267 | 6.91907809      | 6.91907809 |
| 500                             | 6.95904139        | 6.8573325  | 5.54406804      | 5.8260748  |
| 1000                            | 6.63346846        | 6.8260748  | 4.07918125      | 4.25527251 |
| 1500                            | 6.93951925        | 6.80617997 | 4.04139269      | 4.20411998 |
| 2000                            | 6.68124124        | 6.64345268 | 4.04139269      | 4.07918125 |



Reporte en UFC/mL

| NÚMERO DE<br>OCD | CONTROL |         | MUESTRA TRATADA |         |
|------------------|---------|---------|-----------------|---------|
|                  | A       | B       | A               | B       |
| 0                | 2300000 | 2800000 | 2550000         | 2550000 |
| 500              | 1500000 | 1300000 | 500000          | 560000  |
| 1000             | 1200000 | 1300000 | 20000           | 16000   |
| 1500             | 1000000 | 1100000 | 12000           | 11000   |
| 2000             | 1400000 | 1100000 | 1600            | 1900    |

| NÚMERO DE<br>ONDAS DE<br>CHOQUE | LOG <sub>10</sub> |            |                 |            |
|---------------------------------|-------------------|------------|-----------------|------------|
|                                 | CONTROL           |            | MUESTRA TRATADA |            |
|                                 | A                 | B          | A               | B          |
| 0                               | 6.36172784        | 6.44715803 | 6.40654018      | 6.40654018 |
| 500                             | 6.17609126        | 6.11394335 | 5.69897         | 5.74818803 |
| 1000                            | 6.07918125        | 6.11394335 | 4.30103         | 4.20411998 |
| 1500                            | 6                 | 6.04139269 | 4.07918125      | 4.04139269 |
| 2000                            | 6.14612804        | 6.04139269 | 3.20411998      | 3.2787536  |



EXP.# 4

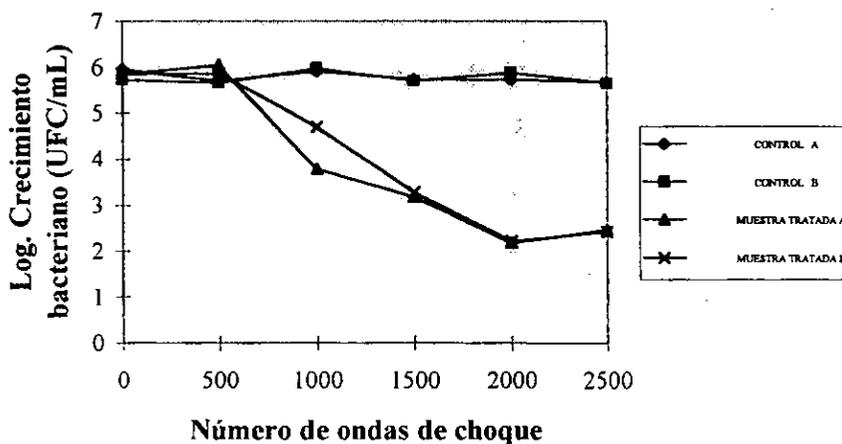
FECHA

21/07/97

| NÚMERO DE<br>OCD | CONTROL |        | MUESTRA TRATADA |        |
|------------------|---------|--------|-----------------|--------|
|                  | A       | B      | A               | B      |
| 0                | 910000  | 540000 | 725000          | 725000 |
| 500              | 520000  | 470000 | 1100000         | 760000 |
| 1000             | 830000  | 960000 | 6000            | 50000  |
| 1500             | 560000  | 510000 | 1490            | 1920   |
| 2000             | 540000  | 770000 | 149             | 162    |
| 2500             | 480000  | 450000 | 287             | 266    |

| NÚMERO DE<br>ONDAS DE<br>CHOQUE | LOG <sub>10</sub> |            |                 |            |
|---------------------------------|-------------------|------------|-----------------|------------|
|                                 | CONTROL           |            | MUESTRA TRATADA |            |
|                                 | A                 | B          | A               | B          |
| 0                               | 5.95904139        | 5.73239376 | 5.86033801      | 5.86033801 |
| 500                             | 5.71600334        | 5.67209786 | 6.04139269      | 5.88081359 |
| 1000                            | 5.91907809        | 5.98227123 | 3.77815125      | 4.69897    |
| 1500                            | 5.74818803        | 5.70757018 | 3.17318627      | 3.28330123 |
| 2000                            | 5.73239376        | 5.88649073 | 2.17318627      | 2.20951501 |
| 2500                            | 5.68124124        | 5.65321251 | 2.4578819       | 2.42488164 |

**Resultados preliminares (21/07/97)**



Reporte en UFC/mL

EXP.# 5

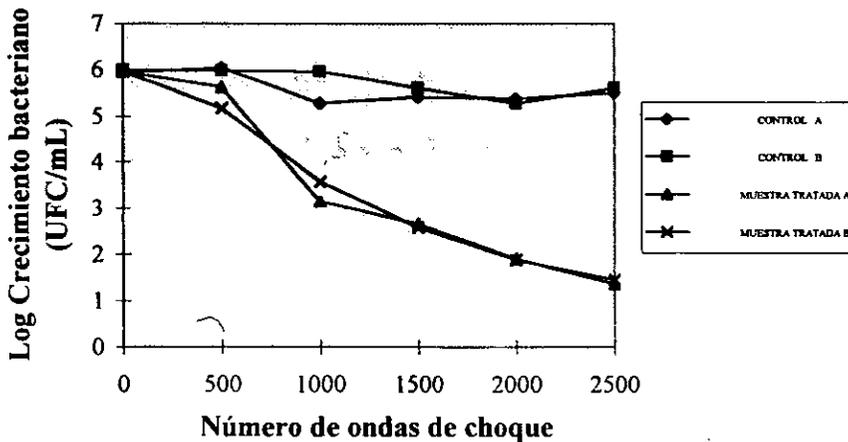
FECHA

20/08/97

| NÚMERO DE<br>OCD | CONTROL |        | MUESTRA TRATADA |        |
|------------------|---------|--------|-----------------|--------|
|                  | A       | B      | A               | B      |
| 0                | 860000  | 970000 | 915000          | 915000 |
| 500              | 1100000 | 960000 | 410000          | 150000 |
| 1000             | 190000  | 900000 | 1400            | 3800   |
| 1500             | 260000  | 400000 | 450             | 380    |
| 2000             | 240000  | 190000 | 80              | 76     |
| 2500             | 320000  | 400000 | 23              | 28     |

| NÚMERO<br>DE<br>DESCARGAS | LOG <sub>10</sub> |            |                 |            |
|---------------------------|-------------------|------------|-----------------|------------|
|                           | CONTROL           |            | MUESTRA TRATADA |            |
|                           | A                 | B          | A               | B          |
| 0                         | 5.93449845        | 5.98677173 | 5.96142109      | 5.96142109 |
| 500                       | 6.04139269        | 5.98227123 | 5.61278386      | 5.17609126 |
| 1000                      | 5.2787536         | 5.95424251 | 3.14612804      | 3.5797836  |
| 1500                      | 5.41497335        | 5.60205999 | 2.65321251      | 2.5797836  |
| 2000                      | 5.38021124        | 5.2787536  | 1.90308999      | 1.88081359 |
| 2500                      | 5.50514998        | 5.60205999 | 1.36172784      | 1.44715803 |

**Resultados preliminares (20/08/97)**



Reporte en UFC/mL

## Estadística<sup>49</sup>

Ensayo sin protección :

| Número de ensayo | Log. 10 del Crecimiento de <i>E.coli</i> ATCC 10536 |                            |       |
|------------------|---|----------------------------|-------|
|                  | Al inicio del tratamiento                           | Al término del tratamiento | $d_i$ |
| 1                | 5.42  | 2.44                       | 2.98  |
| 2                | 6.92  | 4.05                       | 2.87  |
| 3                | 6.41  | 3.23                       | 3.18  |
| 4                | 5.86  | 2.18                       | 3.68  |
| 5                | 5.96  | 1.89                       | 4.07  |

Sean  $\mu_1$  y  $\mu_2$  el log 10 del crecimiento bacteriano promedio al inicio del tratamiento y después de la aplicación de 2000 ondas de choque, respectivamente. De manera que:

1.  $H_0: \mu_1 = \mu_2$  o  $\mu_D = \mu_1 - \mu_2 = 0$ .
2.  $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$  o  $\mu_D = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ .
3.  $\alpha = 0.05$
4. Región crítica :  $t < -2.776$  y  $t > 2.776$ , donde :

$$t = ( \bar{d} - d_0 ) / ( S_d / n^{1/2} )$$

con  $v = 4$  grados de libertad

5. Cálculos: La media y la desviación estándar muestrales para las  $d_i$  's son:

$$\bar{d} = 3.356 \quad \text{y} \quad S_d = 0.506$$

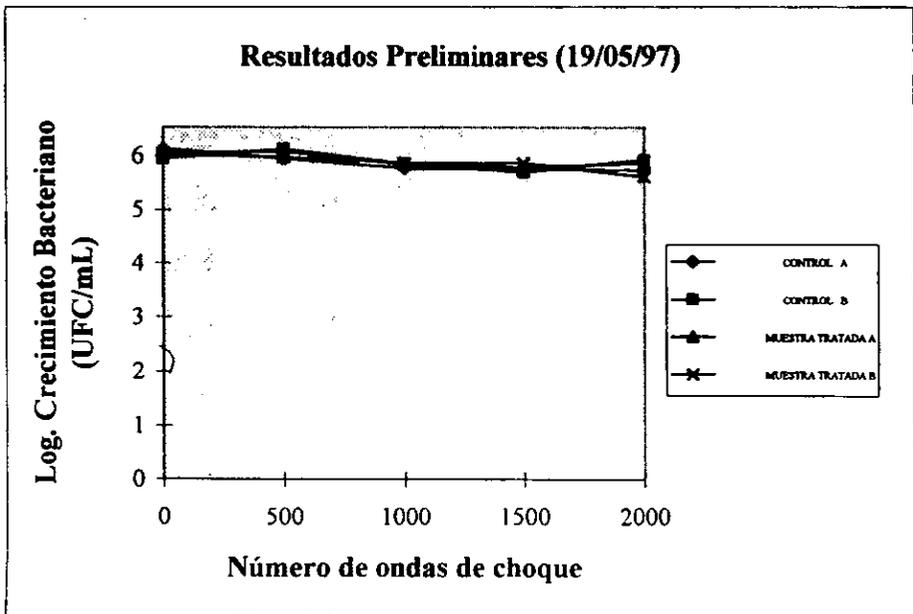
Por lo tanto,

$$t = 14.83$$

6. El estadístico  $t$  si es significativo

| NÚMERO DE<br>OCD | CONTROL |         | MUESTRA TRATADA |         |
|------------------|---------|---------|-----------------|---------|
|                  | A       | B       | A               | B       |
| 0                | 1300000 | 900000  | 1100000         | 1100000 |
| 500              | 900000  | 1300000 | 1200000         | 930000  |
| 1000             | 580000  | 710000  | 670000          | 730000  |
| 1500             | 570000  | 490000  | 610000          | 720000  |
| 2000             | 520000  | 830000  | 710000          | 400000  |

| NÚMERO DE<br>ONDAS DE<br>CHOQUE | LOG <sub>10</sub> |            |                 |            |
|---------------------------------|-------------------|------------|-----------------|------------|
|                                 | CONTROL           |            | MUESTRA TRATADA |            |
|                                 | A                 | B          | A               | B          |
| 0                               | 6.11394335        | 5.95424251 | 6.04139269      | 6.04139269 |
| 500                             | 5.95424251        | 6.11394335 | 6.07918125      | 5.96848295 |
| 1000                            | 5.76342799        | 5.85125835 | 5.8260748       | 5.86332286 |
| 1500                            | 5.75587486        | 5.69019608 | 5.78532984      | 5.8573325  |
| 2000                            | 5.71600334        | 5.91907809 | 5.85125835      | 5.60205999 |



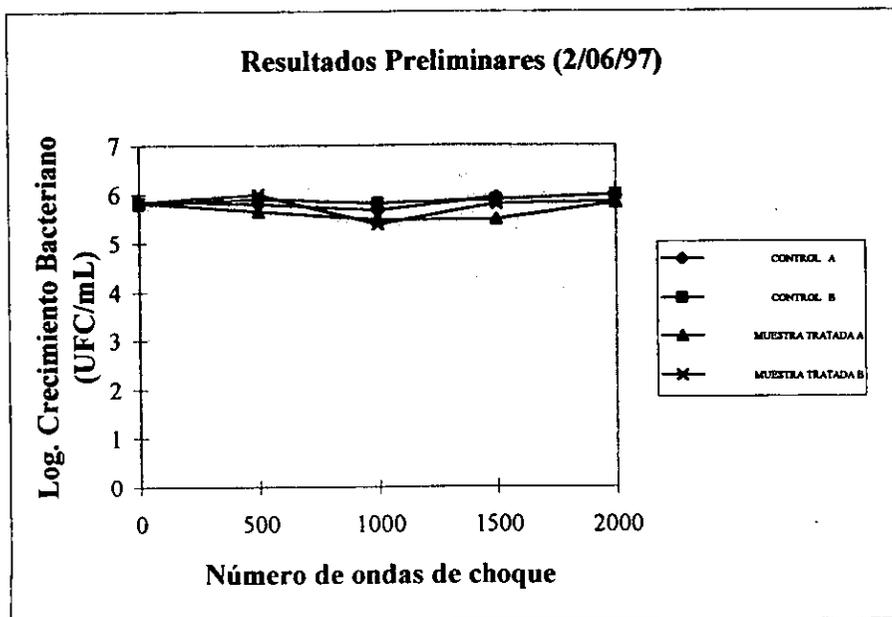
EXP.# 2

FECHA

2/06/97

| NÚMERO DE<br>OCD | CONTROL |        | MUESTRA TRATADA |        |
|------------------|---------|--------|-----------------|--------|
|                  | A       | B      | A               | B      |
| 0                | 730000  | 620000 | 675000          | 675000 |
| 500              | 630000  | 800000 | 440000          | 970000 |
| 1000             | 460000  | 640000 | 300000          | 240000 |
| 1500             | 860000  | 760000 | 310000          | 630000 |
| 2000             |         | 970000 | 660000          | 720000 |

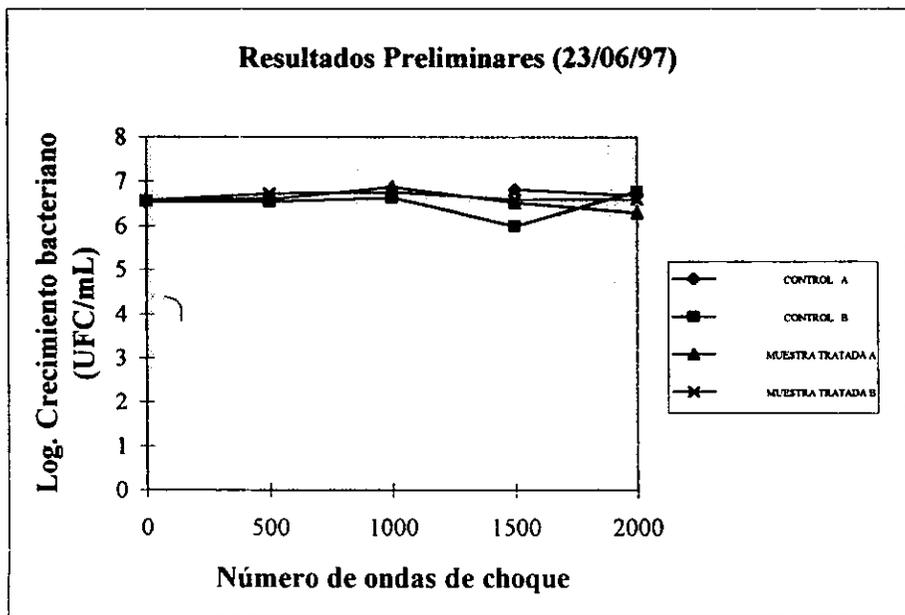
| NÚMERO DE<br>ONDAS DE<br>CHOQUE | LOG <sub>10</sub> |            |                 |            |
|---------------------------------|-------------------|------------|-----------------|------------|
|                                 | CONTROL           |            | MUESTRA TRATADA |            |
|                                 | A                 | B          | A               | B          |
| 0                               | 5.86332286        | 5.79239169 | 5.82930377      | 5.82930377 |
| 500                             | 5.79934055        | 5.90308999 | 5.64345268      | 5.98677173 |
| 1000                            | 5.66275783        | 5.80617997 | 5.47712125      | 5.38021124 |
| 1500                            | 5.93449845        | 5.88081359 | 5.49136169      | 5.79934055 |
| 2000                            |                   | 5.98677173 | 5.81954394      | 5.8573325  |



Reporte en UFC/mL

| NÚMERO DE<br>OCD | CONTROL |         | MUESTRA TRATADA |         |
|------------------|---------|---------|-----------------|---------|
|                  | A       | B       | A               | B       |
| 0                | 4000000 | 3500000 | 3750000         | 3750000 |
| 500              | 4200000 | 3500000 | 4000000         | 5500000 |
| 1000             |         | 4300000 | 7800000         | 5900000 |
| 1500             | 6700000 | 1000000 | 3300000         | 3900000 |
| 2000             | 4800000 | 6000000 | 2000000         | 4000000 |

| NÚMERO DE<br>ONDAS DE<br>CHOQUE | LOG <sub>10</sub> |            |                 |            |
|---------------------------------|-------------------|------------|-----------------|------------|
|                                 | CONTROL           |            | MUESTRA TRATADA |            |
|                                 | A                 | B          | A               | B          |
| 0                               | 6.60205999        | 6.54406804 | 6.57403127      | 6.57403127 |
| 500                             | 6.62324929        | 6.54406804 | 6.60205999      | 6.74036269 |
| 1000                            |                   | 6.63346846 | 6.8920946       | 6.77085201 |
| 1500                            | 6.8260748         | 6          | 6.51851394      | 6.59106461 |
| 2000                            | 6.68124124        | 6.77815125 | 6.30103         | 6.60205999 |



EXP.# 4

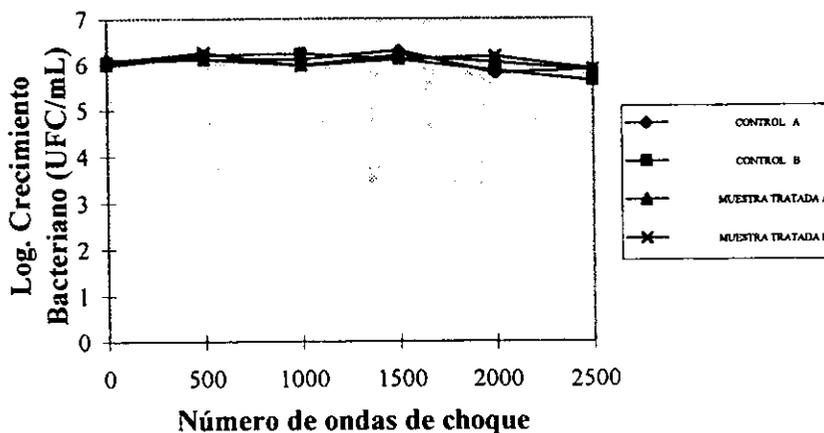
FECHA

30/06/97

| NÚMERO DE<br>OCD | CONTROL |         | MUESTRA TRATADA |         |
|------------------|---------|---------|-----------------|---------|
|                  | A       | B       | A               | B       |
| 0                | 1300000 | 960000  | 1130000         | 1130000 |
| 500              | 1300000 | 1600000 | 1300000         | 1800000 |
| 1000             | 1300000 | 1700000 | 950000          | 930000  |
| 1500             | 2000000 | 1300000 | 1600000         | 1300000 |
| 2000             | 640000  | 720000  | 1100000         | 1500000 |
| 2500             | 760000  | 420000  | 740000          | 770000  |

| NÚMERO DE<br>ONDAS DE<br>CHOQUE | LOG <sub>10</sub> |            |                 |            |
|---------------------------------|-------------------|------------|-----------------|------------|
|                                 | CONTROL           |            | MUESTRA TRATADA |            |
|                                 | A                 | B          | A               | B          |
| 0                               | 6.11394335        | 5.98227123 | 6.05307844      | 6.05307844 |
| 500                             | 6.11394335        | 6.20411998 | 6.11394335      | 6.25527251 |
| 1000                            | 6.11394335        | 6.23044892 | 5.97772361      | 5.96848295 |
| 1500                            | 6.30103           | 6.11394335 | 6.20411998      | 6.11394335 |
| 2000                            | 5.80617997        | 5.8573325  | 6.04139269      | 6.17609126 |
| 2500                            | 5.88081359        | 5.62324929 | 5.86923172      | 5.88649073 |

### Resultados preliminares (30/06/97)



Reporte en UFC/mL

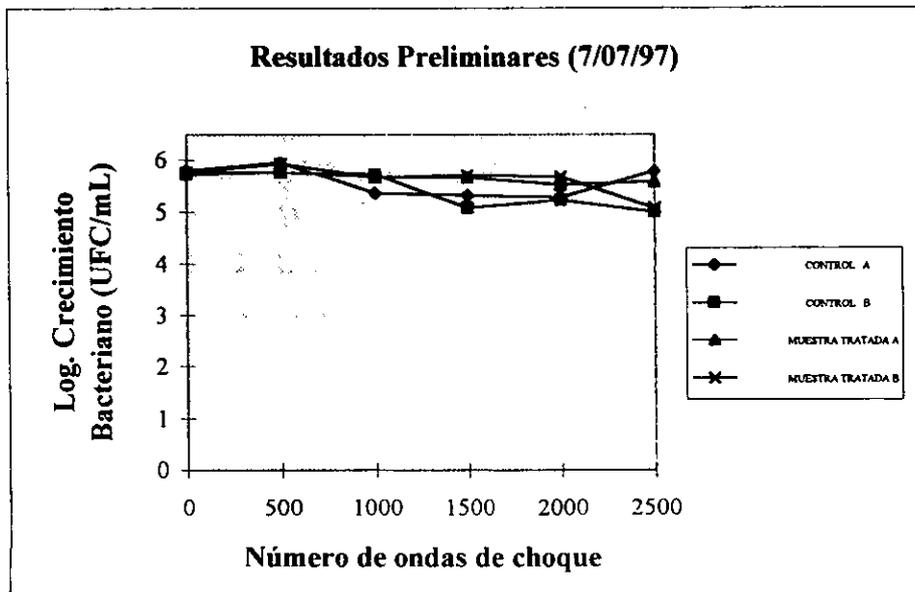
EXP.# 5

FECHA

7/07/97

| NÚMERO DE<br>OCD | CONTROL |        | MUESTRA TRATADA |        |
|------------------|---------|--------|-----------------|--------|
|                  | A       | B      | A               | B      |
| 0                | 630000  | 510000 | 570000          | 570000 |
| 500              | 880000  | 570000 | 570000          | 840000 |
| 1000             | 230000  | 520000 | 460000          | 450000 |
| 1500             | 210000  | 120000 | 450000          | 500000 |
| 2000             | 190000  | 170000 | 330000          | 460000 |
| 2500             | 600000  | 100000 | 380000          | 120000 |

| NÚMERO DE<br>ONDAS DE<br>CHOQUE | LOG <sub>10</sub> |            |                 |            |
|---------------------------------|-------------------|------------|-----------------|------------|
|                                 | CONTROL           |            | MUESTRA TRATADA |            |
|                                 | A                 | B          | A               | B          |
| 0                               | 5.79934055        | 5.70757018 | 5.75587486      | 5.75587486 |
| 500                             | 5.94448267        | 5.75587486 | 5.75587486      | 5.92427929 |
| 1000                            | 5.36172784        | 5.71600334 | 5.66275783      | 5.65321251 |
| 1500                            | 5.32221929        | 5.07918125 | 5.65321251      | 5.69897    |
| 2000                            | 5.2787536         | 5.23044892 | 5.51851394      | 5.66275783 |
| 2500                            | 5.77815125        | 5          | 5.5797836       | 5.07918125 |



Reporte en UFC/mL

## Estadística<sup>49</sup>

Ensayo con protección :

| Número de ensayo | Log. 10 del Crecimiento de <i>E.coli</i> ATCC 10536 |                            |       |
|------------------|---|----------------------------|-------|
|                  | Al inicio del tratamiento                           | Al término del tratamiento | $d_i$ |
| 1                | 6.04  | 5.72                       | 0.32  |
| 2                | 5.83  | 5.84                       | -0.01 |
| 3                | 6.57  | 6.45                       | 0.12  |
| 4                | 6.05  | 5.87                       | 1.08  |
| 5                | 5.76  | 5.32                       | 0.44  |

Sean  $\mu_1$  y  $\mu_2$  el log 10 del crecimiento bacteriano promedio al inicio del tratamiento y después de la aplicación de 2000 ondas de choque, respectivamente. De manera que:

1.  $H_0: \mu_1 = \mu_2$  o  $\mu_D = \mu_1 - \mu_2 = 0$ .
2.  $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$  o  $\mu_D = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ .
3.  $\alpha = 0.05$
4. Región crítica :  $t < -2.776$  y  $t > 2.776$ , donde :

$$t = (\bar{d} - d_0) / (S_d / n^{1/2})$$

con  $v = 4$  grados de libertad

5. Cálculos: La media y la desviación estándar muestrales para las  $d_i$ 's son:

$$\bar{d} = 0.39 \quad \text{y} \quad S_d = 0.423$$

Por lo tanto,

$$t = 2.06$$

6. El estadístico  $t$  no es significativo en el nivel 0.05.

Realizamos un análisis del efecto de las ondas de choque débiles sobre la bacteria *E.coli* ATCC 10536, tomando en cuenta parámetros utilizados para la evaluación de los métodos de esterilización. Los resultados que presentamos de ninguna manera son definitivos para incluir a las OCD como un método alternativo, pero sí representan una condición real y nos dan un indicio sobre las perspectivas a futuro.

Los parámetros para la cinética de muerte microbiana son<sup>7</sup> :

El índice de mortalidad, o constante de velocidad, es la pendiente en el gráfico de la población sobreviviente al tratamiento. La constante de velocidad  $K$  es calculada por la ecuación:

$$K = (1/t) [ \log_{10} (N_0 / N_t) ]$$

donde  $t$  = tiempo en minutos,  $N_0$  = número de microorganismos iniciales y  $N_t$  = número de sobrevivientes al tiempo  $t$ . El tiempo depende de la frecuencia utilizada, por lo cual es expresado como la dosis aplicada, es decir, el número de ondas de choque.

El valor  $D$  para la reducción decimal a un tiempo determinado es el tiempo requerido en minutos, a una temperatura específica, para producir una reducción del 90% en el número de microorganismos. Es el recíproco de la constante de velocidad cuando el índice de mortalidad es exponencial<sup>4</sup>. Matemáticamente es:

$$D = t / ( \log_{10} N_0 - \log_{10} N_u )$$

donde  $t$  = tiempo en que se destruye el 90% de la población inicial,  $N_0$  = población inicial, y  $N_u$  = población sobreviviente. Debe recordarse que  $t$  es la dosis aplicada en número de ondas de choque.

Dado que en el cálculo estadístico sólo existe una diferencia significativa en el tratamiento sin protección, tomamos en cuenta únicamente estos resultados para hacer el seguimiento. Con respecto a los resultados de los ensayos en que se empleó protección se discutirá en otro apartado la trascendencia de dicho comportamiento, a partir de los resultados de las mediciones de presión en ambos ensayos.

En esta sección presentamos los resultados, por duplicado, de la población sobreviviente a lo largo del tratamiento, así como el cálculo de la constante de velocidad en cada intervalo de ondas de choque recibidas. En las gráficas está representado el promedio del comportamiento obtenido para cada ensayo.

Después se encuentran las tablas de la constante de velocidad, del valor D, además del promedio (por duplicado). Los cálculos se realizaron a partir de 500 OCD recibidas y durante todo el ensayo.

También agrupamos el comportamiento del valor D y la constante de velocidad a lo largo de los ensayos y a partir de estos resultados diseñamos el comportamiento teórico de las OCD como método de esterilización.

## MEDICIÓN DEL CAMPO DE PRESIÓN<sup>4</sup>

Parámetros empleados en el MEXILIT II:

Capacitancia: 80 nF.

Conductividad de agua:  $(930 \pm 2) \mu\text{S}/\text{cm}$

Temperatura del agua:  $(27 \pm 0.1) ^\circ\text{C}$

Voltaje:  $(20 \pm 0.1) \text{ kV}$

Osciloscopio: 2 mV/div, 50  $\mu\text{seg}/\text{div}$

### RESULTADOS:

#### Primera parte

Tabla 1.

| PARÁMETROS ESTADÍSTICOS | TRANSDUCTOR SOLO (SIN VIAL Y SIN BOLSA) | TRANSDUCTOR (CON VIAL Y SIN BOLSA) | TRANSDUCTOR (CON VIAL Y CON BOLSA) |
|-------------------------|---|------------------------------------|------------------------------------|
| Media                   | 4.52 mV                                 | 3.61 mV                            | 2.77 mV                            |
| Desv. Estándar          | 1.14 mV                                 | 1.09 mV                            | 0.85 mV                            |
| Coef. de variación      | 0.252                                   | 0.303                              | 0.306                              |
| Valor máximo            | 7.22 mV                                 | 6.48 mV                            | 4.92 mV                            |
| Valor mínimo            | 2.76 mV                                 | 1.28 mV                            | 1.26 mV                            |
| Valor más confiable     | $(5 \pm 3) \text{ mV}$                  | $(4 \pm 3) \text{ mV}$             | $(3 \pm 2) \text{ mV}$             |

Las diferencias entre los tres casos son significativas con un nivel de significancia de 0.1 %.

<sup>4</sup> Mediciones realizadas por Achim Loske y Arturo Méndez en el Laboratorio de Choques Débiles del IFUNAM.

## Segunda parte

Tabla 2.

| PARÁMETROS ESTADÍSTICOS | TRANSDUCTOR SOLO | TRANSDUCTOR CON BOLSA |
|-------------------------|------------------|-----------------------|
| Media                   | 4.23 mV          | 2.93 mV               |
| Desv. Estándar          | 0.84 mV          | 0.84 mV               |
| Coef. de variación      | 0.199            | 0.287                 |
| Valor máximo            | 5.96 mV          | 4.86 mV               |
| Valor mínimo            | 2.90 mV          | 1.88 mV               |
| Valor más confiable     | (4±2) mV         | (3±2) mV              |

La diferencia entre ambos casos es significativa con un nivel de significancia de 0.1%.

Como puede observarse, todos los datos están dados en mV, es decir, el valor del máximo pico de voltaje emitido por el transductor, lo cual no altera los resultados debido a que para obtener resultados en unidades de presión únicamente se multiplicarían todos los valores por el mismo factor.

Las variaciones tan grandes entre los registros de presión obtenidos en condiciones iguales son típicas en este tipo de fenómenos<sup>23</sup>.

### **MEDICIÓN DEL PASO DE LUZ A TRAVÉS DE LAS BOLSAS<sup>5</sup>**

Se encontró que las bolsas de plástico absorben la totalidad de la luz correspondiente a la región ultravioleta de 200 a 400 nm.

<sup>5</sup> Mediciones realizadas por el Dr. Jorge García.

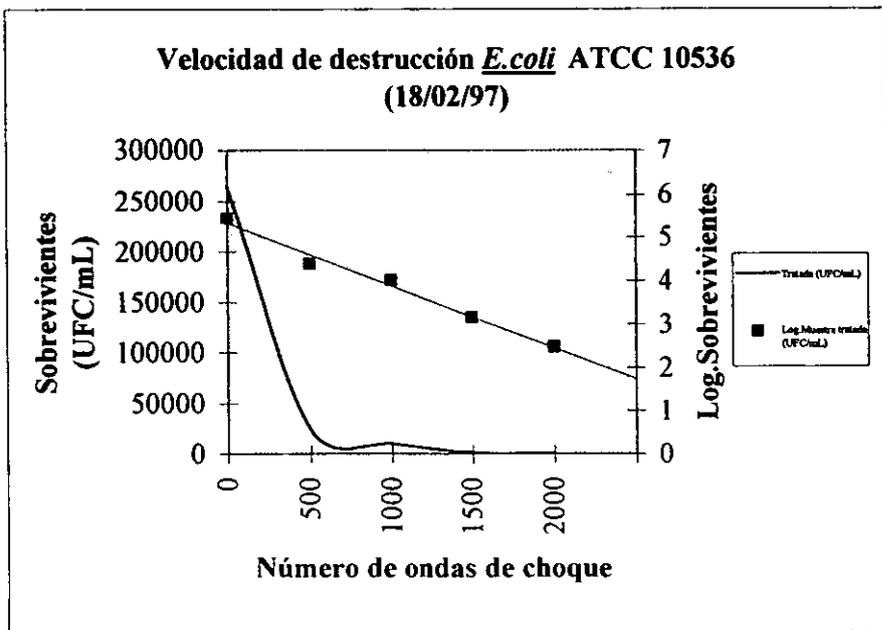
EXP.# 1

FECHA

18/02/97

| NÚMERO DE<br>OCD | MUESTRA TRATADA |        |
|------------------|-----------------|--------|
|                  | A               | B      |
| 0                | 265000          | 265000 |
| 500              | 28000           | 20000  |
| 1000             | 10000           | 10000  |
| 1500             | 1400            | 1400   |
| 2000             | 380             | 210    |

| NÚMERO DE<br>OCD | K1          | K2          |
|------------------|-------------|-------------|
| 0                |             |             |
| 500              | 0.001952176 | 0.002244432 |
| 1000             | 0.001423246 | 0.001423246 |
| 1500             | 0.001518079 | 0.001518079 |
| 2000             | 0.001421731 | 0.001550513 |



REPORTE: MUESTRA TRATADA EN UFC/mL  
K EN 1/ONDAS DE CHOQUE DÉBILES

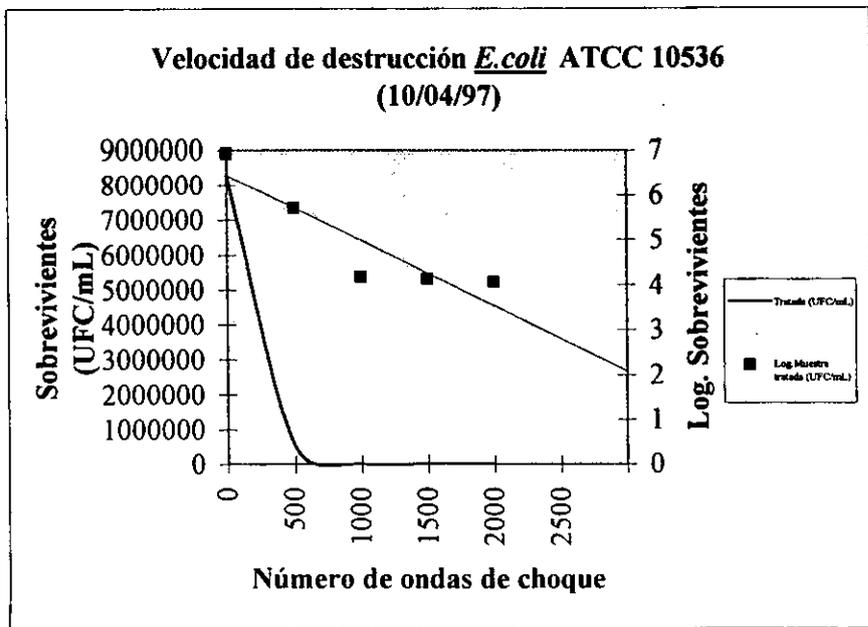
EXP.# 2

FECHA

10/04/97

| NÚMERO DE<br>OCD | MUESTRA TRATADA |         |
|------------------|-----------------|---------|
|                  | A               | B       |
| 0                | 8300000         | 8300000 |
| 500              | 350000          | 670000  |
| 1000             | 12000           | 18000   |
| 1500             | 11000           | 16000   |
| 2000             | 11000           | 12000   |

| NÚMERO DE<br>OCD | K1          | K2          |
|------------------|-------------|-------------|
| 0                |             |             |
| 500              | 0.00275002  | 0.002186007 |
| 1000             | 0.002839897 | 0.002663806 |
| 1500             | 0.001918457 | 0.001809972 |
| 2000             | 0.001438843 | 0.001419948 |



REPORTE: MUESTRA TRATADA EN UFC/mL  
K EN 1/ONDAS DE CHOQUE DÉBILES

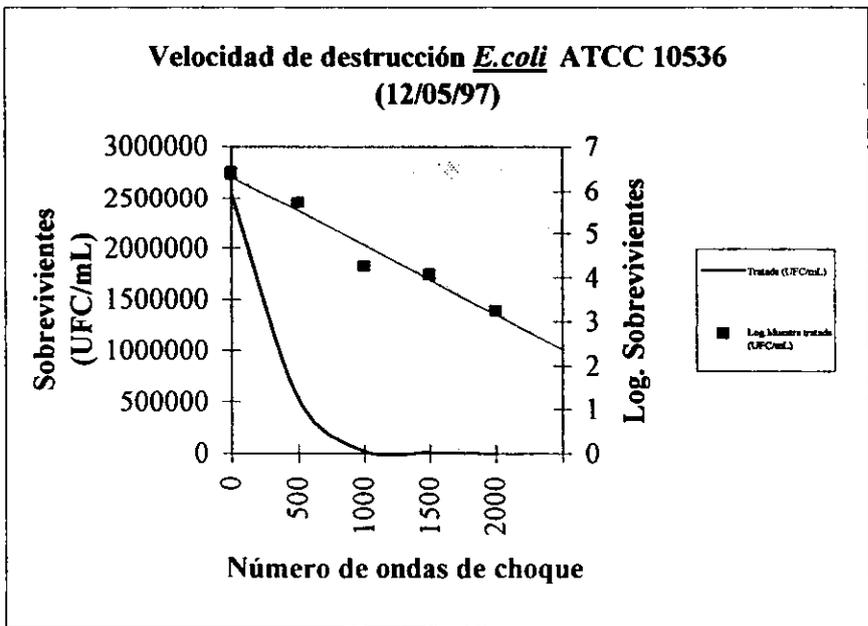
EXP.# 3

FECHA

12/05/97

| NÚMERO DE<br>OCD | MUESTRA TRATADA |         |
|------------------|-----------------|---------|
|                  | A               | B       |
| 0                | 2550000         | 2550000 |
| 500              | 500000          | 560000  |
| 1000             | 20000           | 16000   |
| 1500             | 12000           | 11000   |
| 2000             | 1600            | 1900    |

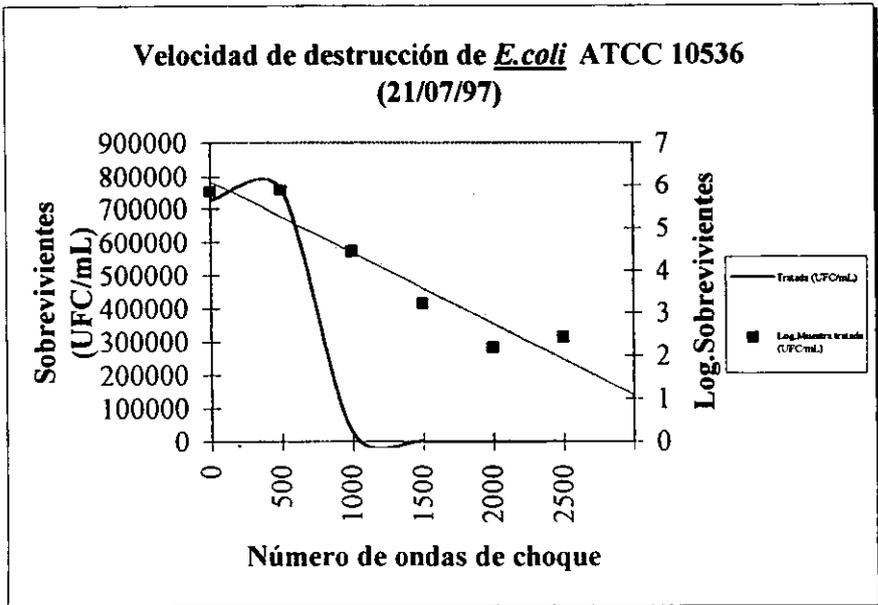
| NÚMERO DE<br>OCD | K1          | K2          |
|------------------|-------------|-------------|
| 0                |             |             |
| 500              | 0.00141514  | 0.001316704 |
| 1000             | 0.00210551  | 0.00220242  |
| 1500             | 0.001551573 | 0.001576765 |
| 2000             | 0.00160121  | 0.001563893 |



REPORTE: MUESTRA TRATADA EN UFC/mL  
K EN 1/ONDAS DE CHOQUE DÉBILES

| NÚMERO DE<br>OCD | MUESTRA TRATADA |        |
|------------------|-----------------|--------|
|                  | A               | B      |
| 0                | 725000          | 725000 |
| 500              | 1100000         | 760000 |
| 1000             | 6000            | 50000  |
| 1500             | 1490            | 1920   |
| 2000             | 149             | 162    |
| 2500             | 287             | 266    |

| NÚMERO DE<br>OCD | K1           | K2           |
|------------------|--------------|--------------|
| 0                |              |              |
| 500              | -0.000362109 | -4.09512E-05 |
| 1000             | 0.002082187  | 0.001161368  |
| 1500             | 0.001791434  | 0.001718025  |
| 2000             | 0.001843576  | 0.001825411  |
| 2500             | 0.001360982  | 0.001374183  |



REPORTE: MUESTRA TRATADA EN UFC/mL  
K EN 1/ONDAS DE CHOQUE DÉBILES

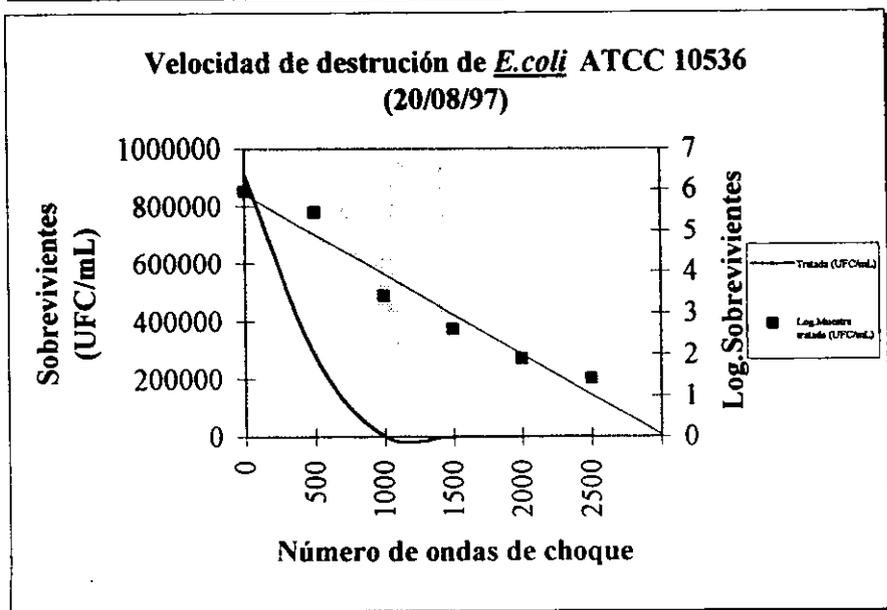
EXP.# 5

FECHA

20/08/97

| NÚMERO DE<br>OCD | MUESTRA TRATADA |        |
|------------------|-----------------|--------|
|                  | A               | B      |
| 0                | 915000          | 915000 |
| 500              | 410000          | 150000 |
| 1000             | 1400            | 3800   |
| 1500             | 450             | 380    |
| 2000             | 80              | 76     |
| 2500             | 23              | 28     |

| NÚMERO DE<br>OCD | K1          | K2          |
|------------------|-------------|-------------|
| 0                |             |             |
| 500              | 0.000697274 | 0.00157066  |
| 1000             | 0.002815293 | 0.002381637 |
| 1500             | 0.002205472 | 0.002254425 |
| 2000             | 0.002029166 | 0.002040304 |
| 2500             | 0.001839877 | 0.001805705 |



REPORTE: MUESTRA TRATADA EN UFC/mL  
K EN 1/ONDAS DE CHOQUE DÉBILES

EXP.# 1

FECHA

18/02/97

| NÚMERO DE<br>OCD | D1         | D2         | K1         | K2         |
|------------------|------------|------------|------------|------------|
| 0                |            |            |            |            |
| 500              | 512.248978 | 445.547073 | 0.00195218 | 0.00224443 |
| 1000             | 702.619286 | 702.619286 | 0.00142325 | 0.00142325 |
| 1500             | 658.727438 | 658.727438 | 0.00151808 | 0.00151808 |
| 2000             | 703.367868 | 644.947713 | 0.00142173 | 0.00155051 |
| PROMEDIO         | 644.240893 | 612.960378 | 0.00157881 | 0.00168407 |

EXP.# 2

FECHA

10/04/97

| NÚMERO DE<br>OCD | D1         | D2         | K1         | K2         |
|------------------|------------|------------|------------|------------|
| 0                |            |            |            |            |
| 500              | 363.633706 | 457.455165 | 0.00275002 | 0.00218601 |
| 1000             | 352.125466 | 375.402771 | 0.0028399  | 0.00266381 |
| 1500             | 521.252252 | 552.494712 | 0.00191846 | 0.00180997 |
| 2000             | 695.003003 | 704.250932 | 0.00143884 | 0.00141995 |
| PROMEDIO         | 483.003607 | 522.400895 | 0.00223681 | 0.00201994 |

EXP.# 3

FECHA

12/05/97

| NÚMERO DE<br>OCD | D1         | D2         | K1         | K2         |
|------------------|------------|------------|------------|------------|
| 0                |            |            |            |            |
| 500              | 706.64369  | 759.471959 | 0.00141514 | 0.0013167  |
| 1000             | 474.944271 | 454.045963 | 0.00210551 | 0.00220242 |
| 1500             | 644.507376 | 634.209918 | 0.00155157 | 0.00157676 |
| 2000             | 624.527662 | 639.429817 | 0.00160121 | 0.00156389 |
| PROMEDIO         | 612.65575  | 621.789415 | 0.00166836 | 0.00166494 |

REPORTE: D EN ONDAS DE CHOQUE  
K EN 1/ONDAS DE CHOQUE

EXP.# 4

FECHA

21/07/97

| NÚMERO DE<br>OCD | D1          | D2          | K1          | K2          |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 0                |             |             |             |             |
| 500              | -2761.59668 | -24419.3259 | -0.00036211 | -4.0951E-05 |
| 1000             | 480.264317  | 861.053515  | 0.00208219  | 0.00116137  |
| 1500             | 558.211871  | 582.06387   | 0.00179143  | 0.00171802  |
| 2000             | 542.42411   | 547.821684  | 0.00184358  | 0.00182541  |
| 2500             | 734.763335  | 727.705356  | 0.00136098  | 0.00137418  |
| PROMEDIO         | 578.915908  | 679.661106  | 0.00176955  | 0.00151975  |

EXP.# 5

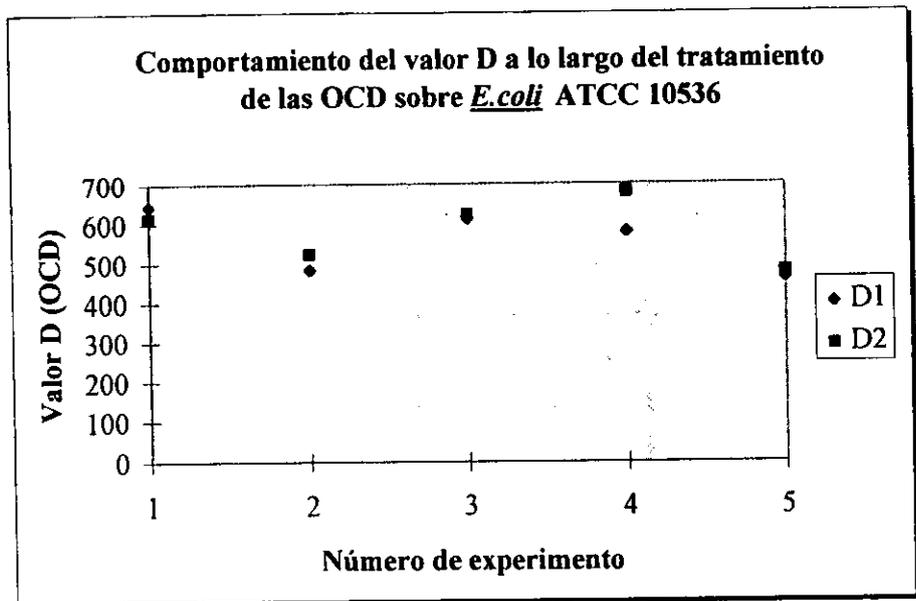
FECHA

20/08/97

| NÚMERO DE<br>OCD | D1         | D2         | K1         | K2         |
|------------------|------------|------------|------------|------------|
| 0                |            |            |            |            |
| 500              | 1434.15547 | 636.675162 | 0.00069727 | 0.00157066 |
| 1000             | 355.202808 | 419.87918  | 0.00281529 | 0.00238164 |
| 1500             | 453.417602 | 443.572086 | 0.00220547 | 0.00225442 |
| 2000             | 492.813412 | 490.1231   | 0.00202917 | 0.0020403  |
| 2500             | 543.514504 | 553.800247 | 0.00183988 | 0.00180571 |
| PROMEDIO         | 461.237081 | 476.843654 | 0.00191742 | 0.00201055 |

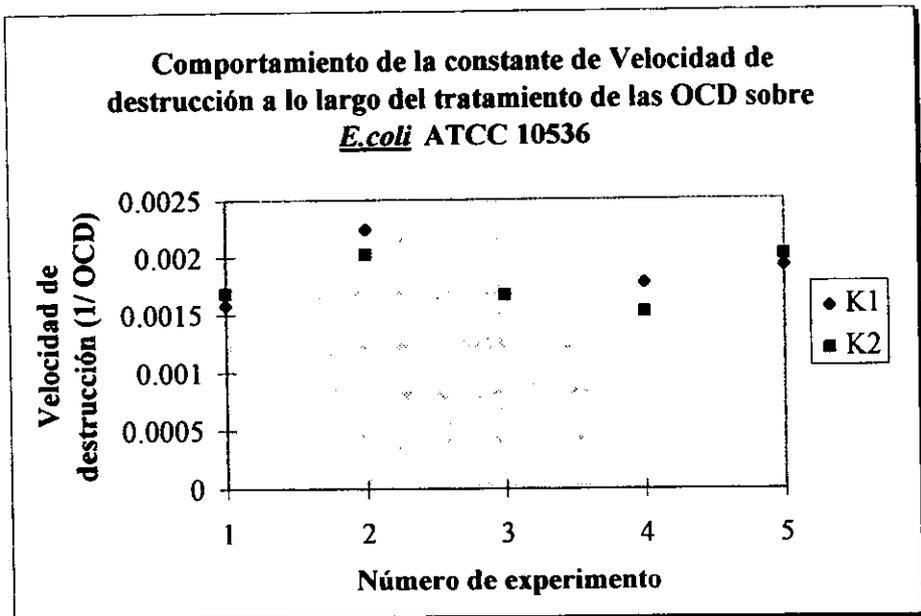
REPORTE: D EN ONDAS DE CHOQUE  
K EN 1/ONDAS DE CHOQUE

| FECHA    | D1         | D2         |           |            |
|----------|------------|------------|-----------|------------|
| 18/02/97 | 644.240893 | 612.960378 |           |            |
| 10/04/97 | 483.003607 | 522.400895 |           |            |
| 12/05/97 | 612.65575  | 621.789415 | DESV. ST. | 77.6756638 |
| 21/07/97 | 578.915908 | 679.661106 | PROM      | 569.370869 |
| 20/08/97 | 461.237081 | 476.843654 | C.V.      | 13.6423671 |



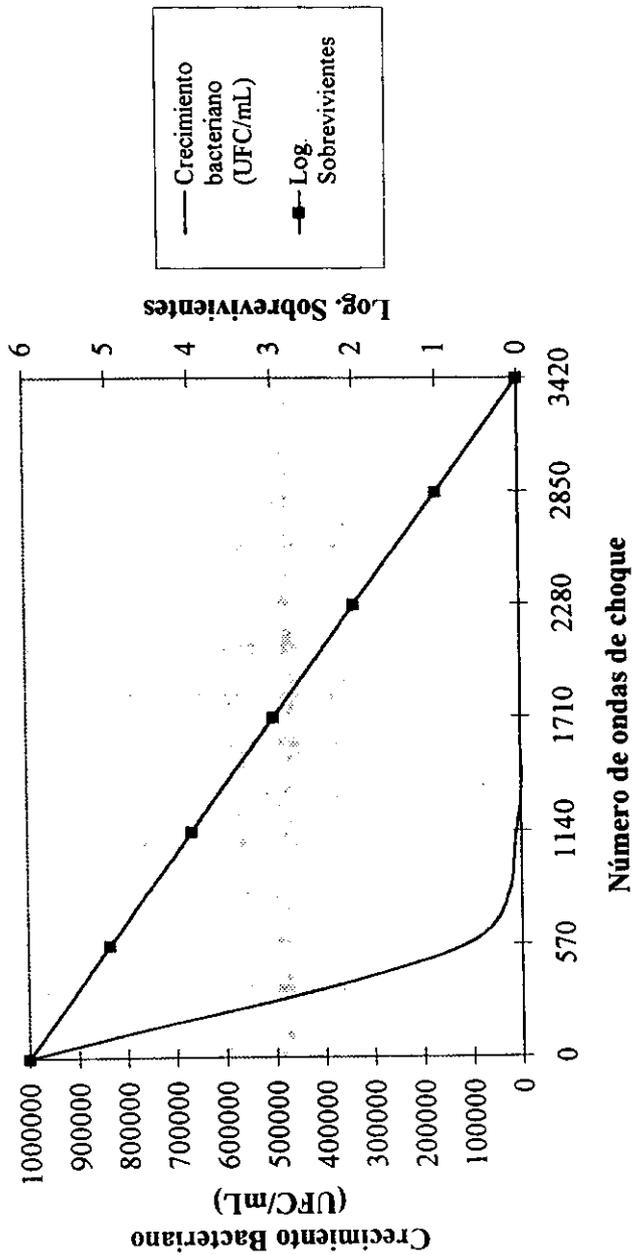
REPORTE: D EN ONDAS DE CHOQUE  
K EN 1/ONDAS DE CHOQUE

| FECHA    | K1         | K2         |          |            |
|----------|------------|------------|----------|------------|
| 18/02/97 | 0.00157881 | 0.00168407 |          |            |
| 10/04/97 | 0.00223681 | 0.00201994 |          |            |
| 12/05/97 | 0.00166836 | 0.00166494 | DES. ST. | 0.00022954 |
| 21/07/97 | 0.00176955 | 0.00151975 | PROM     | 0.00180702 |
| 20/08/97 | 0.00191742 | 0.00201055 | C.V.     | 12.7027805 |



REPORTE:     D EN ONDAS DE CHOQUE  
               K EN 1/ONDAS DE CHOQUE

Comportamiento teórico de la aplicación de ondas de choque sobre *E. coli* ATCC 10536



---

## 7. EN CAMINO A LA ESTERILIZACIÓN...

---

La esterilización es un término absoluto, de modo que un objeto está o no estéril. Para determinar si un objeto está realmente estéril como resultado de un proceso, debe evaluarse matemáticamente en términos de probabilidad la existencia de microorganismos sobrevivientes al final del mismo. Esta información se obtiene al estudiar la cinética de muerte de los microorganismos para un sistema dado.

El presente trabajo abarcó la primera etapa del proyecto encaminado a considerar a las OCD como un método de esterilización. Los resultados en primera instancia pueden dividirse en dos tipos: el primero, en el que se observa una disminución logarítmica de la población microbiana al someterla al tratamiento de las OCD, y la segunda, en la que al intentar dilucidar si el efecto en realidad se debe a las OCD o a la luz ultravioleta generada por la descarga eléctrica no se observa un efecto aparente.

Para determinar el índice de mortalidad en la bacteria *E. coli* ATCC 10536 como resultado de la aplicación de las ondas de choque, partimos de una cuenta inicial de aproximadamente  $10^5$  a  $10^7$  UFC/mL, el cual es un número cercano a la cantidad encontrada como contaminante en algunos productos alimenticios<sup>2</sup>. La disminución observada al graficar la población sobreviviente contra el número de OCD aplicadas, tiene forma exponencial y, por lo tanto, de una cinética de primer orden. Lo anterior se confirma al graficar el logaritmo de la población microbiana sobreviviente contra el número de OCD, en la que se obtiene una línea recta, cuya pendiente es la constante de velocidad ( $K$ ) o índice de mortalidad para la dosis aplicada.

Las gráficas de las muestras en las que se utilizó protección contra la luz ultravioleta generada en la descarga eléctrica para producir a las ondas de choque, no sufren un cambio significativo en el número de UFC/mL después

del tratamiento. Lo anterior se confirmó aplicando una prueba estadística, la *t de Student*, en la cual no se obtiene diferencia significativa, a diferencia de las muestras tratadas sin protección.

Los siguientes parámetros dentro de la estimación de la cinética de muerte sólo consideran las muestras tratadas sin protección, ya que son las únicas con significancia estadística.

Los valores de la constante de velocidad para cada intervalo de OCD tienen valores similares (alrededor de 0.0018) entre ellas para un mismo ensayo y un coeficiente de variación de 12.7% entre los diferentes ensayos. Tomando en cuenta que estas cifras son de poblaciones microbianas, la variación puede considerarse mínima. El valor de  $K$  significa que por onda de choque aplicada ocurre una reducción del número inicial de bacterias de 0.0018 en promedio.

El recíproco del índice de mortalidad es el valor  $D$ , que representa la dosis o número de OCD aplicadas en el cual la población microbiana se reduce en un valor decimal, es decir, para reducir el 90% de la cuenta inicial de microorganismos. Internacionalmente existen tablas de valores de  $D$  para cada método de esterilización, dadas a una temperatura y microorganismo específico. De acuerdo al valor promedio de  $K$ , el valor promedio de  $D$  es alrededor de 569 OCD, los resultados se proporcionan en número de ondas de choque aplicadas en lugar de unidades de tiempo, debido a que la frecuencia es un parámetro que puede variarse en el equipo, en esta ocasión se empleó una frecuencia de 1 OCD por cada 2.5 seg, lo que da un tiempo total de 24 minutos aproximadamente, es decir, para reducir una población de  $10^6$  a  $10^5$  UFC/mL, se necesitan someter a los microorganismos a las mismas condiciones durante aproximadamente 24 minutos y así sucesivamente. Para inactivar la población inicial de bacterias, se requieren cerca de  $6D$ , o bien 144 minutos o cerca de 3500 OCD. Es importante señalar que la frecuencia depende de la energía, es decir, del voltaje aplicado. A 18 kV, si el MEXILIT II genera 1 OCD cada segundo, el proceso duraría 54 minutos.

Haciendo dicho análisis, y a partir del promedio de los resultados, se trazó una gráfica en la que se observa el comportamiento teórico del tratamiento.

Con respecto a la otra parte de los resultados en los ensayos que se llevaron a cabo con bolsa de protección, debido a que no hubo un efecto

aparente de las OCD sobre los microorganismos, se realizaron mediciones de presión para observar si la bolsa además de impedir el paso de la luz ultravioleta impedía el paso de la OCD. El estudio se llevó a cabo de diversas formas para obtener una mayor información; en la primera se midió la presión con el transductor descubierto, dentro del vial y dentro del vial en la bolsa de protección. En la segunda parte se midió la presión con el transductor descubierto y dentro de la bolsa de protección. Los resultados indican que existe una disminución de la presión alrededor del 20 % con el paso a través del vial empleado como contenedor del transductor y una reducción de otro 20 % al colocar el vial dentro de la bolsa.

Existen muchos puntos a considerar para ajustar el MEXILIT II de manera que los resultados del efecto de OCD sobre los microorganismos puedan mejorarse. La frecuencia de disparo para generar las OCD, podría reducirse hasta 1 OCD por segundo, con lo que disminuye considerablemente el tiempo que dura el proceso. El voltaje está relacionado con la presión de la onda de choque, a mayores voltajes mayores presiones. Entre mayor es el voltaje, menor es el aumento de presión relacionado al mismo aumento de voltaje. La evaluación de la cinética de muerte que realizamos, se llevó a cabo a 18 mil volts, de modo que puede aumentarse el voltaje unos 7 kV, generando con ello un aumento significativo de presión. Otro elemento que influye notablemente en la presión que puede ejercer la onda de choque, además de la energía, es el tipo de reflector. El reflector refleja a la onda de choque y podría concentrarla en un punto determinado. En el reflector parabólico que empleamos, la presión se distribuye en una superficie, mientras que en el elíptico, la presión se concentra sólo en una región más pequeña<sup>23</sup>. El reflector parabólico refleja una OCD plana que abarca una región mayor, al utilizar un reflector elíptico la presión de la OCD aumenta y podría tener un mayor efecto sobre los microorganismos, pero la cantidad de muestras que pueden ser sometidas es muy inferior.

Otros parámetros que deben ser tomados en cuenta y que son independientes del Mexilit II, son el material del que está hecho el contenedor, que como ya vimos, reduce en un 20 % la presión de la OCD, por lo tanto, se requieren evaluar diferentes tipos de viales para elegir el que tenga una menor interferencia.

No sabemos con certeza si la luz ultravioleta contribuye o no a la disminución observada en la población de microorganismos. Para saber si logra pasar las paredes del vial y ejercer un efecto letal sobre la suspensión de microorganismos, se tiene que exponer a este posible efecto un microorganismo cuyas características lo hagan evidente, por ejemplo, un microorganismo que al sufrir mutaciones producto de la luz ultravioleta modifique su pigmentación como *Serratia sp.* Debido a que el plástico de las bolsas que impiden el paso de la luz ultravioleta, también disminuyen la presión de la OCD, se sugiere utilizar un método de generación de OCD como el piezoeléctrico o el electromagnético, los cuales no producen luz ultravioleta.

Una vez optimizadas todas las condiciones de experimentación, el siguiente paso es tratar a otros grupos de microorganismos con OCD, inicialmente enfocándose en bacterias, grampositivas y gramnegativas, patógenas y no patógenas, además de aquéllas que presentan mecanismos de resistencia y después otros grupos como hongos y protozoarios. Se pueden establecer las condiciones óptimas de exposición a las OCD con el microorganismo más resistente a ellas y así poder evaluar nuevamente la cinética de muerte, estableciendo el valor  $D$  para cada uno de los microorganismos empleados.

La etapa siguiente consistiría en modificar el tipo de medios empleados, haciéndolos más complejos cada vez, primero añadiendo componentes de bajo peso molecular hasta llegar a macromoléculas como proteínas y grasas animales para determinar si existe un tipo de interferencia con el medio que además, promueve el crecimiento de los microorganismos. Lo anterior obedece a que las OCD puedan utilizarse de manera industrial, ya que resulta muy costoso e impráctico para cubrir pequeñas necesidades que pueden satisfacerse con equipo más pequeños. El empleo de las OCD como método de esterilización está pensado para ser una alternativa a los métodos existentes, con lo que se evitarían tratamientos térmicos que alteran las propiedades no sólo de los alimentos sino también de algunos principios activos en medicamentos, disminuyendo así el uso conservadores y aditivos que enmascaran las propiedades perdidas con los tratamiento actuales.

Hasta este punto las OCD tienen el mismo perfil que las técnicas novedosas que han estado en investigación, de las cuales algunas ya tienen aplicaciones y otras todavía se encuentran en fase de experimentación.

---

---

## 8. CONCLUSIONES

---

Los resultados del presente trabajo son preliminares y muestran el comportamiento del sistema en las condiciones de trabajo.

- Las ondas de choque débiles en una suspensión de *E.coli* ATCC 10536 sin protección, disminuyen la cantidad inicial de microorganismos, la cual fue estadísticamente significativa.
- Las ondas de choque débiles en una suspensión de *E.coli* ATCC 10536 que tuvieron protección contra la luz ultravioleta no tienen un efecto letal estadísticamente significativo.
- Las mediciones de presión efectuadas en el Laboratorio de Choques Débiles, demuestran una disminución de la presión de la OCD a través del vial empleado como contenedor de la muestra y una segunda disminución al emplear las bolsas de protección.
- Empleando únicamente las muestras que sí tienen un efecto significativo se tiene que: las ondas de choque débiles tienen un efecto letal sobre la cepa de *E.coli* ATCC 10536, la cual fue evaluada mediante una cinética de muerte cuyo resultado es la reducción de un 90 % de la población inicial en 569 OCD aproximadamente. Para la completa inactivación de la población inicial, sería necesario administrar seis veces este número de OCD.
- Dadas las condiciones de trabajo, los resultados pueden mejorarse modificando parámetros tanto del Mexilit II como del material en el que se expone la suspensión de bacterias.

- Con los estudios realizados en esta investigación no se puede afirmar que el efecto letal sobre la suspensión de *E. coli* ATCC 10536 es debida a la radiación ultravioleta, a las ondas de choque débiles o a ambas, mostrando únicamente que sí pueden inactivar en su conjunto a una población microbiana y partiendo de este hecho se le puede contemplar como una opción de cuyo desarrollo favorable permita su implementación como método alternativo, ya sea de esterilización o en su defecto de conservación.

Finalmente se establecieron las bases y las condiciones para darle continuidad a este estudio y tal vez, algún día, obtener un beneficio tecnológico de aplicación inmediata.

---

---

## 9. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Atlas, Ronald M. *Microbiology. Fundamentals and Applications*. 2ª.ed. New York. McMillan. 1993. pp. 87-111.
2. AOAC Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists Vol I. 15<sup>th</sup>.ed. Washington D.C. Association of Official Analytical Chemists, Inc. 1990. pp. 435,436,803-805.
3. Berens M.E., Welander C.E., Griffin A.S., McCullough D.L. Effect of acoustic shock waves on clonogenic growth and drug sensitivity of human tumor cells *in vitro*. *The Journal of Urology*. 1989; 142: 1090-1094.
4. Block, S.S. En *Encyclopedia of Microbiology. Vol 4*. Joshua Lederberg (eds.) New York. Academic Press. 1994. pp. 87-103.
5. Boisseau, P. Irradiation and the food industry in France. *Food Technology*. 1994; 48 (5): 138-140.
6. Brauch G., Hänsler U., Ludwig H. The effect of pressure on bacteriophages. *High Pressure Research*. 1990; 5: 767-769.
7. Brock T., Madigan M. *Microbiología*. 6ªed. México. Prentice Hall Hispanoamericana. 1993. pp. 327-369.
8. Brümmer F., Brenner J., Bräuner T., Hüsler D. Effect of shock waves on suspended and immobilized L1210 cells. *Ultrasound. in Med. & Biol*. 1989; 15 (3): 229-239.

9. Butz P., Heinisch O., Tauscher B. Hydrostatic high pressure applied to food sterilization III: application to spices and spice mixtures. *High Pressure Research*. 1994; 12: 239-243.
10. Carl K., Ludwig H. Pressure effects on bacteriophage T4. *High Pressure Research*. 1991; 7: 176-178.
11. Cruz G. D., Chamizo J. A., Garriz A. *Estructura atómica un enfoque químico*. México. Addison-Wesley Iberoamericana. 1987. pp. 81-91.
12. Delius M. Medical applications and bioeffects of extracorporeal shock waves. *Shock Waves*. 1994; 4: 55-72.
13. Delius M., Draenert K., Al Diek Y., Draenert Y. Biologicals effects of shock waves: *in vivo* effect of high energy pulses on rabbit bone. *Ultrasound in Med. & Biol.* 1995; 21 (9): 1219-1225.
14. Floros J. D., Liang H. Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials. *Food Technology*. 1994; 48 (12): 79-84.
15. García M.L., Burgos J., Sanz B., Ordoñez J.A. Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of two strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*. 1989; 67: 619-628.
16. Graff J., Richter K.D., Pastor J. Effects of high energy shock wave on bony tissue. *Urol. Res*. 1988; 16: 252.
17. Hoover D.G. Pressure effects on biological systems. *Food Technology*. 1993; 47 (6): 150-155.
18. Kedrinskii V.K. The role of cavitation effects in the mechanisms of destruction and explosive processes. *Shock Waves*. 1997; 7: 63-76.
19. Knorr D. Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technology*. 1993; 47 (6): 156-161.
20. Lechowich, R. Food safety implications of high hydrostatic pressure as a food processing method. *Food Technology*. 1993; 47 (6): 170-171.

21. Lillard, H.S. Decontamination of poultry skin by sonication. *Food Technology*. 1994; 48 (12): 72-73.
22. Loaharanu, P. Status and prospects of food irradiation. *Food Technology*. 1994; 48 (5): 124-131.
23. Loske A. *Generación de ondas de choque en agua por rompimiento eléctrico*. UNAM. Tesis maestría. 1990. pp. 1-100.
24. Loske A. *Interacción de ondas de choque débiles en agua con la materia: diseño de electrodos y reflectores novedosos para litotriptores electrohidráulicos*. Instituto de Física. UNAM. Tesis doctorado. 1992-1994.
25. Loske A., López J.A., Prieto F.E., Alanís L.J., Vázquez J.E., Larrondo F. Primeras pruebas en vivo en roedores y perros en México con el generador de ondas de choque Mexilit I. *Vet. Méx.* 1993; 24 (1): 7-13.
26. Loske A.M., Prieto F.E. Generador de ondas de choque en agua Mexilit I. *Ciencia y Desarrollo*. 1991. 17 (101): 82-89.
27. Loske A.M., Prieto F.E. Las ondas de choque en la litotripsia extracorporal. *Rev Fac. Med. UNAM*. 1990; 33 (2): 113-120.
28. Loske A.M., Prieto F.E. *Fundamentos técnicos de litotripsia extracorporal*. México. Ciencia y Cultura Latinoamérica (en prensa).
29. Loske A.M., Prieto F.E. *Shock waves in medicine, commented bibliographical data base*. México. Coordinación de la investigación científica. UNAM. 1995. ISBN 968-36- 4466- X.
30. Loske A.M., Prieto F.E. The influence of electrode shape on the performance of electrohydraulic lithotripters. *The Journal of Lithotripsy and Stone Disease*. 1993; 5 (4): 228-239.

31. Loske A.M., Prieto F.E. Improving underwater shock wave focusing efficiency. En *Urolithiasis*. Charles Y.C. Pak, Martín Y. Resnick, Glenn M. Preminger (Eds.) Dallas, Texas, EUA. Miller Printer, Inc. 1996. pp. 401-402.
32. Loske A.M., Prieto F.E., López J.A. Primer tratamiento de litotripsia extracorporal en un perro usando un generador de ondas de choque experimental hecho en México. *Vet. Méx.* 1996; 27(2): 41-48.
33. Ludwig H., Gross P., Scigalla W., Sojka B. Pressure inactivation of microorganisms. *High Pressure Research*. 1994; 12: 193-197.
34. Martín O., Ahang Q., Castro A.J., Barbosa-Cánovas G.V., Swanson B.G. Revisión: Empleo de pulsos eléctricos de alto voltaje para la conservación de alimentos. *Microbiología e ingeniería del proceso. Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* 1994; 34 (1): 1-34.
35. Mertens, B. High pressure equipment for the food industry. *High Pressure Research*. 1994; 12: 227-237.
36. Mertens B., Deplace G. Engineering aspects of high-pressure technology in the food industry. *Food Technology*. 1993; 47 (6): 164-169.
37. Morgan T.R., Laudone V.P., Heston W.D., Zeitz L., Fair W. Free radical production by high energy shock waves comparison with ionizing irradiation. *The Journal of Urology*. 1988; 139: 186-189.
38. Murano, E. Irradiation of fresh meats. *Food Technology*. 1995; 49 (12): 52-54.
39. Ohshima T., Tanaka S., Teshima K. Effects of shock wave on microorganisms: An evaluation method of the effects. En Takayama, K. (ed.) *Shock Waves*. Berlin. Springer. 1991. pp.1215-1219.
40. Okamoto M., Kawamura Y., Hayashi R. Application of high pressure to food processing: textural comparison of pressure and heat induced gels of food proteins. *Agric. Biol. Chem.* 1990; 54: 183-189.

41. Prat F., Chapelon J.Y., Ponchon T., Abou El Fadil F., Theillière Y., Pansu D., Berger F., Cathignol D. Cytotoxic effects of shock-wave induced cavitation on cancer tissues and cells. En Takayama, K. (ed.) *Shock Waves*. Berlín. Springer. 1991. pp. 1163-1172.
42. Prieto F.E., Loske A.M. *Underwater shock waves and extracorporeal lithotripsy, an introduction to the bibliography*. México. Coordinación de la investigación científica. UNAM. 1991. pp. 1-166.
43. Prieto F.E., Loske A.M. *Reflectores asimétricos para concentrar ondas de choque*. Dirección general de desarrollo tecnológico. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Expediente núm. 945421. entró a fase nacional en México.
44. Prieto F.E., Loske A.M. Multifocal composite reflectors to concentrate shock waves. Solicitud nacional P.C.T./MX 95/00008. 15 nov. 1995, entró a fase nacional en EUA y Alemania.
45. Qin B., Pothakamury U. R., Vega H., Martín O., Barbosa-Cánovas G. V., Swanson B. G. Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Technology*. 1995; 49 (12): 55-60.
46. Randazzo R.F., Chaussy C.G., Fuchs G.J., Bhuta S.M., Lovrekovich H., deKernion J.B. The *in vitro* and *in vivo* effects of extracorporeal shock waves on malignant cells. *Urol.Res.* 1988; 16: 419-426.
47. Ruiz Marcellán F.J., Ibarz S. Alternativas a la cirugía de la litiasis. Litotricia extracorpórea mediante "Ondas de choque". *Actas. Urol. Esp.* 1984; 8 (4): 247-251.
48. Smelt J.P.P.M., Rijke A.G.F., Hayhurst A. Possible mechanism of high pressure inactivation of microorganisms. *High Pressure Research*. 1994; 12: 199-203.
49. Teshima K., Ohshima T., Tanaka S., Nagai T. Biomechanical effects of shock waves on *Escherichia coli* and  $\lambda$  phage DNA. *Shock Waves*. 1995; 4: 293-297.

50. Thayer, D.W. Wholesomeness of irradiated foods. *Food Technology*. 1994; 48 (5): 132-136.
51. Tornello C., Wurtz P., Largeteau A., Jolibert F., Deschamps A., Ducastaing A., Demazeau G. Recent developments in the use of high hydrostatic pressures in food processing. *High Pressure Research*. 1994; 12: 205-213.
52. USP XXIII. The United States Pharmacopeia The National Formulary. 1993. Sterilization and sterility assurance of compendial articles. pp.1976-1981.
53. Walpole R., Myers R.H. *Probabilidad y estadística*. 3ª. ed. México. Mc Graw-Hill. 1992. pp. 299-329.
54. Yeaman L.D., McCullough D.L., Jerome C.P. Effects of extracorporeal A. shock waves on immature bone growth of the rat. *The Journal of Urology*. 1988; 139: 324.
55. Zimmerman F., Bergman C. Isostatic high-pressure equipment for food preservation. *Food Technology*. 1993; 47 (6): 162-163.
56. Zinsser, H. *Microbiología*. 2ª.ed. Buenos Aires. Médica panamericana. 1994. pp.268-283.

## **Bibliografía de consulta**

Haas C.N., Rose J.B., Gerba C.P., Crockett C.S. What predictive food microbiology can learn from water microbiology. *Food Technology*. 1997; 51 (4): 91-94.

Roberts, T.A. Microbial growth and survival: developments in predictive modeling. *Food Technology*. 1997; 51 (4): 88-90.

Schaffner D.A., Labuza T.P. Predictive microbiology: where are we, and where are we going ? *Food Technology*. 1997; 51 (4): 95-99.

Whiting, R.C. Microbial database building: what have we learned? *Food Technology*. 1997; 51 (4): 82-86.

---

---

## APÉNDICE

---

### 1. Especificaciones de material, equipo y reactivos:

| MATERIAL O EQUIPO                      | MARCA                           | MODELO     |
|--|---------------------------------|------------|
| Agitador magnético                     | Bellco Glass                    | 7769-06003 |
| Autoclave                              | Hirayama                        | HA-240 MII |
| Balanza analítica                      | Sartorius                       | 2842       |
| Baño de agua de temperatura controlada | Precitherm PFV<br>Lakeside      | 4010       |
| Centrifuga                             | Hamilton Bell                   | V 6000     |
| Espectrofotómetro                      | Milton Roy<br>Array - uv vis    | 3000       |
| Fotómetro                              | Lakeside Mannheim<br>Boehringer | 4010       |
| Horno                                  | VWR                             | 1330 G     |
| Incubadora biológica                   | Boekel                          | 132000     |
| Microscopio óptico                     | Olympus                         | BX 40      |
| Osciloscopio                           | Tektronix                       | 2430 A     |

| MATERIAL O EQUIPO  | MARCA               | MODELO            |
|--|---------------------|-------------------|
| Pipetas, matraces, tubos de ensaye, vasos, vidrios de reloj. | Pyrex               | Varios            |
| Pipetas estériles  | Elkay Products Inc. | 127-P507-STR      |
| Refrigerador   | Goldstar            | GR-141            |
| Transductor  | Imotec              | Needle hydrophone |
| Vortex   |                     | 16700             |

### Medios de cultivo

| MEDIO DE CULTIVO  | MARCA | LOTE         |
|---|-------|--------------|
| Agar nutritivo  | Merck | V 768150-613 |
| Agar para cuenta en placa (Agar peptona de caseína-glucosa-extracto de levadura para microbiología) | Merck | V 877063-708 |
| Agar violeta cristal rojo neutro bilis  | Merck | 1406-21272   |
| Caldo nutritivo   | Merck | V 552243-448 |

### Preparación de soluciones

- Cloruro de Sodio al 20 %.

Disolver 20 g. de cloruro de sodio (NaCl) con el volumen de agua destilada suficiente para obtener un volumen final de 100 mL.

- Solución salina isotónica (SSI)

Disolver 0.9 g. de cloruro de sodio (NaCl) con el volumen de agua destilada suficiente para obtener un volumen final de 100 mL.

### **3. Metodología de cuenta en placa para la cuantificación de microorganismos<sup>48</sup>**

Diluir la muestra hasta que un mililitro tenga entre 30 y 300 UFC/mL (unidades formadoras de colonias). Sembrar un mililitro de esa muestra diluida en dos cajas de petri estériles, adicionar de 20 a 25 mililitros del medio de cultivo, previamente fundido y enfriado a 45°C. Mezclar con movimientos rotatorios y dejar solidificar a temperatura ambiente, dejar en incubación el tiempo requerido, contar el número de UFC que se desarrolle en cada caja, hacer un promedio de estos resultados y reportarlo. El testigo de esta prueba consiste en colocar un mililitro de diluyente en lugar de la muestra, proceder como se indicó anteriormente.